

# Mecanismos moleculares de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos e seu papel na imunidade inata

## *Molecular mechanisms of neutrophil extracellular traps formation and their role in innate immunity*

Filipe Fideles Duarte Andrade<sup>1</sup>, Claudia Lopes Penaforte<sup>1</sup>, Clara Araujo Veloso<sup>1</sup>

### Resumo

**Introdução:** Os neutrófilos eliminam micro-organismos extracelularmente por meio de degranulação e produção das armadilhas extracelulares dos neutrófilos. As armadilhas extracelulares de neutrófilos são formadas por cromatina, proteínas granulares e proteínas citoplasmáticas. Além da eliminação de vários micro-organismos, essas estruturas contribuem no aprisionamento de micro-organismos no local inicial da infecção. **Objetivo:** Discutir o processo de formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos, mecanismos moleculares que regulam a produção dessas estruturas e o seu papel na imunidade inata. **Material e Métodos:** Foram realizadas buscas por artigos no *Pubmed*, *Nature*, Periódicos Capes e *PlosOne*, entre dezembro de 2014 a junho de 2015, utilizando diferentes combinações dos descritores: *neutrophil extracellular traps*, *NETs*, *neutrophils*, *netosis*, *innate immunity* e *bacteria*. Foram selecionados estudos que associavam processos moleculares à formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos e/ou abordassem a atividade antimicrobiana dos seus componentes; estudos experimentais *in vivo*, *in vitro* e/ou *in silico*. **Resultados:** Foram localizados 1.383 artigos e após aplicação de critérios de inclusão e exclusão, 41 publicações foram selecionadas. Mecanismos distintos são responsáveis pela formação dessas armadilhas. A dependência da produção de espécies reativas de oxigênio, a composição dessas estruturas e o envolvimento de morte celular variam conforme o estímulo. **Conclusão:** Apesar de apresentarem efeitos benéficos durante infecções, evidências comprovam que as armadilhas extracelulares dos neutrófilos tenham impacto negativo em doenças autoimunes e inflamatórias, deste modo, mecanismos reguladores parecem estar implicados na decisão dos neutrófilos em produzir estas estruturas. A identificação dos mecanismos reguladores da produção dessas armadilhas extracelulares pelos neutrófilos é crucial para o desenvolvimento de terapias alternativas para doenças nas quais essas estruturas estão envolvidas na patogênese.

**Descritores:** Armadilhas Extracelulares; Neutrófilos; Imunidade Inata.

### Abstract

**Introduction:** Neutrophils eliminate microorganisms extracellularly by degranulation and by neutrophil extracellular traps formation. Neutrophil extracellular traps are composed of chromatin, granular proteins, and some cytoplasmic proteins. Beyond elimination of various microorganisms, these structures also contribute to trap pathogens to the initial site of infection. **Objective:** Discuss the process of neutrophil extracellular traps formation, molecular mechanisms that regulate the production of these structures and their role in innate immunity. **Material and Methods:** Pubmed, Nature, Periódicos Capes, and PlosOne were searched from December 2014 to June 2015 using different combinations of the following descriptors: *neutrophil extracellular traps*, *NETs*, *neutrophils*, *netosis*, *innate immunity*, and *bacteria*. Studies associating molecular processes in the formation of neutrophil extracellular traps and/or about the antimicrobial activity of their components; experimental studies *in vivo*, *in vitro* and / or *in silico* were selected. **Results:** We found 1,383 articles and after using inclusion and exclusion criteria, 41 articles were selected. Different mechanisms are responsible in the formation of these traps. The dependence of the production of reactive oxygen species, the composition of these structures and involvement of cell death vary according to the stimulus. **Conclusion:** In spite of their beneficial effects during infections, evidence suggests that neutrophil extracellular traps have a negative impact in autoimmune and inflammatory diseases, thus, regulatory mechanism may be implicated in the decision of neutrophils to produce these structures. The identification of regulatory mechanisms of production of extracellular traps by neutrophils is crucial for the development of alternative therapies for diseases in which these structures are involved in the pathogenesis.

**Descriptors:** Extracellular Traps; Neutrophils; Immunity, Innate.

<sup>1</sup>Centro Universitário de Belo Horizonte (UNIBH)-Belo Horizonte-MG-Brasil.

**Conflito de interesses:** Não

**Contribuição dos autores:** FFDA concepção e planejamento do projeto de pesquisa, obtenção e interpretação dos dados, redação e revisão crítica. CLP interpretação dos dados, redação e revisão crítica. CAV concepção e planejamento do projeto de pesquisa, interpretação dos dados, redação e revisão crítica.

**Contato para correspondência:** Clara Araújo Veloso

**E-mail:** claraveloso@yahoo.com

**Recebido:** 01/12/2015; **Aprovado:** 24/04/2016

## Introdução

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes, constituindo a primeira linha de defesa contra infecções microbianas, desempenhando papel essencial na imunidade inata<sup>(1-2)</sup>. Os neutrófilos eliminam patógenos por meio de fagocitose, degranulação e da formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)<sup>(3)</sup>.

As NETs são um mecanismo utilizado pelo sistema imune inato, em resposta a estímulos patológicos, fisiológicos e farmacológicos, para aprisionar e eliminar micro-organismos, em que os neutrófilos expõem seu conteúdo nuclear complexo com proteínas granulares e citoplasmáticas no ambiente extracelular<sup>(2-3)</sup>. O efeito antimicrobiano das NETs resulta da combinação da cromatina com componentes granulares, histonas e algumas proteínas citoplasmáticas<sup>(4)</sup>.

Apesar da produção das NETs desempenhar um papel essencial nas respostas imunes às infecções, a eliminação reduzida e/ou a produção excessiva podem ter diversos efeitos patológicos. A formação das NETs é observada em doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes e em diversos tipos câncer<sup>(5)</sup>. Em decorrência dos efeitos danosos das NETs no organismo, mecanismos reguladores parecem participar na modulação da geração dessas estruturas<sup>(6)</sup>.

O objetivo desta revisão foi descrever os mecanismos moleculares que participam na formação e na regulação da produção das NETs e a função que essas estruturas desempenham na imunidade inata.

## Material e Métodos

Este estudo constituiu-se em uma revisão de literatura realizada entre os períodos de julho de 2014 a julho de 2015. Os artigos selecionados foram obtidos através das bases de dados *Pubmed*, *PlosOne*, *Nature* e Periódicos Capes, utilizando as seguintes combinações de palavras-chave: *neutrophil extracellular traps and bacteria*; *neutrophil extracellular traps and innate immunity*; *NETs and neutrophils*; *neutrophil extracellular traps and defense* ou *netosis*. Foram incluídos estudos: publicados em inglês; que associavam processos moleculares à formação de NETs e/ou abordassem a atividade antimicrobiana dos componentes das NETs; experimentais *in vitro*, *in vivo* e/ou *in silico*; publicações que apresentassem alta frequência de citação nas bases de dados; publicações a partir de 1º de janeiro de 2004. Foram excluídos artigos que envolvessem formação de “extracellular traps” (etose) em outras células que não os neutrófilos; trabalhos repetidos e, artigos de opinião.

## Resultados da seleção

A busca nas diferentes bases de dados resultou na localização de 1383 artigos, e após a aplicação dos critérios pré-estabelecidos foram incluídos 41 artigos (oito revisões e 33 estudos experimentais). Em adição, dois estudos foram incluídos a partir das referências bibliográficas dos artigos selecionados: uma revisão de 2010 e o estudo “*Bactericidal Action of Histones*” (1958). Esse último foi incluído, devido ao grande número de citações no banco de dados *Pubmed*.

## Resultados

Mecanismos moleculares participantes na produção de NETs  
Mecanismos distintos de formação e liberação de NETs são descritos na literatura. O tempo para formação de NETs, a dependência da produção de EROs (espécies reativas do oxigênio), a composição de NET e o envolvimento de morte celular dependem do tipo de estímulo utilizado<sup>(5,7-10)</sup>. A expulsão de NETs por lise celular é um processo lento, deixando uma janela temporal na qual os patógenos podem estabelecer a infecção<sup>(6)</sup>.

Liberação de NETs por morte celular: netose

*Netose* é o termo utilizado para descrever a morte de neutrófilos que resulta na formação de NETs. Esse é um processo complexo que se inicia com a perda das lobulações nucleares, descondensação da cromatina, dissociação das membranas nuclear interna e externa, com concomitante rompimento dos grânulos, então, o envelope nuclear se desintegra e a cromatina e proteínas granulares se misturam. A netose é finalizada pela desintegração da membrana celular e morte dos neutrófilos com a liberação das NETs para o ambiente externo<sup>(4,10)</sup>. Aproximadamente 24 proteínas são encontradas nas NETs, sendo a maioria de origem granular, algumas nucleares e, raramente, proteínas citoplasmáticas<sup>(11)</sup>.

A formação de NETs por netose requer a produção de EROs gerados pela enzima NADPH oxidase<sup>(10,12)</sup>. A necessidade de EROs na produção de NETs foi mostrada farmacologicamente, pois a inibição da NADPH oxidase por difenileno-iodônio (DPI) bloqueia completamente a liberação de NETs em neutrófilos ativadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)<sup>(10)</sup>. Estudos demonstraram que neutrófilos de pacientes acometidos pela doença granulomatosa crônica, portadores de mutações em alguma das subunidades da NADPH-oxidase, são incapazes de produzir NETs<sup>(10,12)</sup>. No entanto, os neutrófilos desses indivíduos readquirem a habilidade de formar NETs, quando incubados com glicose oxidase, que constitutivamente produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio)<sup>(10)</sup>. Diversos grupos demonstraram que a netose pode ocorrer por processos independentes da NADPH-oxidase<sup>(7,13)</sup>. Acredita-se que ocorra produção de EROs mitocondrial, mediado pela ativação dos canais de potássio de baixa condutância ativados por cálcio<sup>(13)</sup>.

Alguns pesquisadores propõem que os oxidantes gerados pelos EROs inativam as caspases, bloqueando a apoptose e, em associação com outros estímulos, podem desencadear a autofagia, um processo que promove a dissolução das membranas celulares<sup>(14)</sup>. Durante a ativação da netose, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido, promove a ativação e dissociação da elastaseneutrofilica (NE), catepsina G e azurocina, do complexo azuroma (contém mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, lisozima e proteinase 3). A NE migra temporariamente para o citoplasma, onde auxilia na degradação do citoesqueleto de actina, e em seguida para o núcleo, promovendo descondensação parcial da cromatina<sup>(15-16)</sup>. Após a saída dos grânulos, a protease se liga ao citoesqueleto e é ativada pelo complexo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MPO, iniciando a degradação da actina F. Essa etapa é importante na imobilização dos neutrófilos, que possibilita a liberação das NETs, no local exato da infecção, facilitando o rompimento da membrana plasmática antes da expulsão das NETs<sup>(15)</sup>. Em um modelo de infecção

pulmonar por *K. pneumoniae*, os camundongos que apresentam deficiência na atividade da NE não produzem NETs<sup>(16)</sup>. A MPO é outra enzima importante durante a netose, pois contribui com a NE no processo de descondensação da cromatina. Neutrófilos deficientes em MPO são incapazes de produzir NETs<sup>(17)</sup>.

O composto PMA é frequentemente utilizado na indução da netose, pois é um ativador sintético direto da proteína quinase C (PKC) e o mais potente indutor da ativação da NADPH-oxidase<sup>(2,3)</sup>. A sinalização intracelular da netose é controversa, porém, diversos estudos apontam que a indução por PMA é acompanhada pela ativação da via das quinases Raf/MEK/ERK<sup>(18)</sup>, da GTPase da família Rho, a RAC2<sup>(19)</sup> e da Akt<sup>(20)</sup>.

A descondensação da cromatina, que é particularmente densa nos neutrófilos maduros, também é associada com a citrulinização de três das quatro histonas nucleossomais<sup>(4)</sup>. O processo de citrulinização é catalizado pela enzima peptidil arginina deiminase 4 (PAD4), encontrada no núcleo dos granulócitos<sup>(21)</sup>. Neutrófilos de camundongos deficientes de PAD4 são incapazes de produzir NETs, sendo mais suscetíveis à infecções cutâneas, demonstrando que a PAD4 e as NETs possuem função crítica na imunidade inata<sup>(22)</sup>. A identificação dos primeiros inibidores seletivos de PAD4 capazes de afetar a citrulinização celular confirma outros estudos que demonstraram que a inibição da atividade PAD4 é suficiente para interromper a produção das NETs em camundongos e em seres humanos<sup>(22-23)</sup>.

**Produção e liberação de NETs em células intactas**

Estudos recentes mostram que as NETs mitocondriais são o principal tipo de NETs encontrados em lesões traumáticas e após cirurgias<sup>(24)</sup>. O tratamento de neutrófilos com fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), seguido por ativação com fator do complemento C5a, resulta na liberação de NETs que contém DNA mitocondrial, por intermédio de um mecanismo independente de morte celular, mas que necessita da produção de EROs<sup>(8)</sup>.

Neutrófilos estimulados *in vitro* com *S. aureus* apresentam uma forma rápida de expulsão de NETs, independente de oxidantes, não ocorrendo lise celular. Os granulócitos polimorfonucleares ativados liberam vesículas contendo cromatina e proteínas granulares no ambiente extracelular, local no qual ocorre a montagem das NETs<sup>(7)</sup>. Este mecanismo de formação de NETs é dependente de TLR2 (receptores do tipo Toll 2) e do fator do complemento C3. Camundongos deficientes em alguma dessas moléculas são incapazes de produzir NETs, e a capacidade de formação de NETs é restabelecida por meio de tratamento com soro de camundongos selvagens. No entanto, nenhuma das moléculas é suficiente para desencadear a produção de NETs, insinuando que outros mediadores ou mecanismos mais complexos de ativação estejam implicados<sup>(25)</sup>.

A rápida liberação de NETs foi observada em um modelo de infecção cutânea bacteriana em camundongos, utilizando microscopia intravital confocal. Durante a resposta inicial, a maior parte de neutrófilos produtores de NETs degrada o núcleo, mas ainda apresenta DNA intracelular difuso; um pequeno subgrupo se desenvolvem citoplastos móveis e capazes de fagocitar bactérias<sup>(25)</sup>. Como neutrófilos são células diferenciadas de meia vida curta, e com atividade transcricional reduzida, a perda do

núcleo não interfere com as funções necessárias na eliminação de patógenos, como a fagocitose e quimiotaxia<sup>(6)</sup>. Diversos micro-organismos são capazes de escapar das NETs por meio da produção de DNases e de outros fatores que conferem resistência ao aprisionamento e eliminação por este mecanismo<sup>(26-27)</sup>. Portanto, é essencial a existência de uma via alternativa à netose, que permita que os neutrófilos mantenham as habilidades de matar patógenos após a liberação das NETs<sup>(25)</sup>.

### NETs e a defesa do organismo

O aprisionamento e captura de patógenos, e atividade antimicrobiana são funções fundamentais das NETs, prevenindo a disseminação do local inicial da infecção.

A aderência das NETs aos micro-organismos e seu efeito antimicrobiano, parece ocorrer por meio de interações eletrostáticas<sup>(11)</sup> provenientes de compostos presentes nas NETs como DNA complexado com proteínas granulares, nucleares e citoplasmáticas<sup>(3,4,11)</sup>. Contudo, a maioria está presente em pequenas quantidades e apenas algumas possuem atividade antimicrobiana quando associadas com as NETs<sup>(11,28-29)</sup>, como a MPO na eliminação de *S. aureus*<sup>(28)</sup>. A NE é liberada na forma ativa nos vacúolos fagocíticos, mas quando associada às NETs, sua atividade proteolítica é significativamente reduzida. O aumento da atividade da NE é observado após a utilização de DNases, que inibem o complexo DNA/proteína<sup>(29)</sup>. Além disso, o plasma apresenta alta concentração de inibidores das serina proteases, podendo inativar a NE<sup>(9)</sup>. Desta forma, é possível que a elastase tenha uma função importante na indução das NETs<sup>(30)</sup>.

O DNA é o maior componente estrutural das NETs, possuindo rápida atividade antibacteriana mediada por contato. A bactéria *P. aeruginosa* é resistente à morte por esse mecanismo, em virtude de sua habilidade de induzir modificações na superfície celular que estabilizam e protegem a membrana externa da atividade microbicida do DNA<sup>(31)</sup>. Diversas bactérias patogênicas produzem nucleases capazes de degradar o DNA e dissolver as proteínas antimicrobianas das NETs no ambiente extracelular<sup>(26,27,31)</sup>, dando a entender que essas enzimas aumentam a invasividade desses micro-organismos<sup>(26)</sup>.

As histonas são as proteínas mais abundantes das NETs e possuem atividade antimicrobiana direta, eliminando bactérias gram-positivas e negativas<sup>(32)</sup> e parasitos<sup>(33)</sup>. Experimentos utilizando anticorpos anti-histonas mostram a inibição da eliminação de diversos micro-organismos<sup>(3,33)</sup>. O mecanismo de toxicidade dessas proteínas não foi elucidado, mas como são catiônicas, é possível que se associem a membranas microbianas, resultando em rompimento ou tornando-as permeáveis a pequenos fatores<sup>(4)</sup>. A atividade fungicida das NETs é atribuída principalmente à proteína citoplasmática calprotectina, liberada durante a netose na forma solúvel ou ligada às NETs<sup>(11)</sup>. A atividade fungicida da calprotectina é proveniente da capacidade de quelar zinco, íon necessário para o crescimento desses micro-organismos<sup>(11)</sup>. A importância dessa proteína com ação fungicida é comprovada pela maior susceptibilidade de camundongos deficientes da subunidade S00A9 do heterodímero da calprotectina à candidíase subcutânea e pulmonar<sup>(11)</sup>.

As NETs também desempenham funções importantes no

combate aos vírus, evitando a fusão com as células-alvo e por meio de neutralização direta dos vírions<sup>(34-36)</sup>. O vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) estimula a netose por meio de reconhecimento dos ácidos nucleicos virais pelos receptores TLR-7 e TLR-8. A inativação dos vírions nas NETs é mediada pela MPO e pela  $\alpha$ -defensina. O HIV-1 possui um mecanismo de escape da atividade antiviral das NETs, em que a glicoproteína gp120 do envelope induz a produção de IL-10 pelas células dendríticas que por intermédio de interação com CD209, inibe a produção de NETs<sup>(34)</sup>.

A controvérsia da contribuição das NETs para a imunidade inata é vista, em parte, nas técnicas de plaqueamento empregadas para detecção da morte de patógenos mediada pelas NETs. Nesses métodos, as bactérias se aderem formando uma única colônia, o que dificulta a diferenciação entre agrupamento e morte de micro-organismos<sup>(4)</sup>. Um estudo mostrou que a adição de DNase, após esses experimentos nas amostras em que NETs são formadas, libera bactérias vivas capazes de proliferação<sup>(37)</sup>. No entanto, a utilização de outros métodos para avaliação da morte de micro-organismos, como a utilização de inibidores seletivos a componentes presentes nessas estruturas, como anticorpos anti-histona<sup>(3,33)</sup>, quelantes<sup>(11)</sup>, fosfatases<sup>(31)</sup>, e técnicas que avaliam a viabilidade ou atividade metabólica, demonstram que as NETs possuem atividade antimicrobiana direta *in vitro*, mas estudos adicionais são necessários para estabelecer a função das NETs *in vivo*.

A relevância das NETs na imunidade inata foi observada indiretamente em pacientes com doença granulomatosa crônica<sup>(12)</sup>. Esses indivíduos são mais susceptíveis a infecções pulmonares por *Aspergillus spp.*, em função da incapacidade dos neutrófilos de produzir NETs e apresentar fagocitose ineficiente. De modo adicional, camundongos deficientes em enzimas essenciais para produção de NETs, como MPO<sup>(17)</sup>, NE<sup>(16)</sup> ou PAD4<sup>(22)</sup> são mais susceptíveis a infecções por micro-organismos oportunistas.

A significância das NETs *in vivo*, no combate a doenças infecciosas, é observada em modelos utilizando camundongos<sup>(11,25)</sup>, no entanto, poucos estudos comprovam o papel desse mecanismo em seres humanos. Alguns trabalhos mostram que a formação reduzida de NETs está associada ao aumento da susceptibilidade a infecções microbianas e septicemia<sup>(38)</sup>. Recém-nascidos e idosos apresentam comprometimento da formação de NETs, que impacta na capacidade dos neutrófilos de conter os micro-organismos no local inicial da infecção e também de influenciar as fases iniciais da resposta imune adaptativa<sup>(38-39)</sup>.

Os componentes das NETs não são seletivos à eliminação de apenas patógenos, produzindo também danos às células adjacentes<sup>(40-41)</sup>. A sua estrutura evita a difusão das proteínas granulares no meio extracelular, de modo que ocorre a concentração de moléculas tóxicas que danificam a superfície celular<sup>(36)</sup>. Em um modelo de infecção sistêmica por *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), o dano hepático foi atribuído às NETs e não à ação direta do patógeno nesse tecido. Camundongos deficientes de NE ou PAD4 são incapazes de formar NETs e parecem estar protegidos do dano colateral promovido por essas estruturas<sup>(41)</sup>. Em razão da toxicidade das NETs para o organismo, mecanismos reguladores podem estar implicados na decisão dos neutrófilos

em produzir estas estruturas.

Os neutrófilos possuem mecanismos que os permitem identificar os patógenos, conforme o tamanho e ativar diferentes respostas antimicrobianas. A netose é preferencialmente ativada quando os neutrófilos são expostos a micro-organismos grandes para serem eliminados por fagocitose, como a *Candida albicans*, na forma de hifa. A indução de diferentes respostas utilizando a discriminação do tamanho parece limitar a liberação de NETs, evitando a ocorrência de danos colaterais<sup>(40)</sup>. Estudos adicionais são necessários para elucidação dos demais fatores participantes na decisão dos neutrófilos em liberar NETs.

### Conclusão

As NETs proporcionam aos neutrófilos um novo mecanismo de defesa no combate a infecções microbianas. A desregulação da produção e/ou da eliminação dessas estruturas desempenha uma função essencial na patogênese de doenças autoimunes e danos teciduais. O entendimento dos mecanismos atuantes na formação das NETs é essencial para o desenvolvimento de terapias alternativas para doenças, nas quais essas estruturas contribuem na patogênese e no tratamento de imunodeficiências cuja produção de NETs está comprometida. Pesquisas que tratam das NETs, além de elucidar características dessas estruturas, auxiliam na descoberta de novos aspectos da biologia dos neutrófilos e da imunologia.

### Referências

1. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
2. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189(6):2689-95. doi: 10.4049/jimmunol.1201719.
3. 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.
4. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012;198(5):773-83. doi: 10.1083/jcb.201203170.
5. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) -formation and implications. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):277-84.
6. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):513-30. doi: 10.1007/s00281-013-0384-6.
7. Pilszczek 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. doi: 10.4049/jimmunol.1000675.
8. Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1438-44. doi: 10.1038/cdd.2009.96.
9. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784-94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671.
10. 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
11. 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. doi: 10.1371/journal.ppat.1000639.
12. 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. doi: 10.1182/blood-2009-05-221606.
13. Doua DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(9):2817-22. doi: 10.1073/pnas.1414055112.
14. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenaabeele P, VandenBerghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):581-8. doi: 10.1038/cdd.2011.1.
15. 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. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.044.
16. 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. doi: 10.1083/jcb.201006052.
17. 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. doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.
18. 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. doi: 10.1038/nchembio.496.
19. Lim MB, Kuiper JW, Katchky A, Goldberg H, Glogauer M. Rac2 is required for the formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 2011;90(4):771-6. doi: 10.1189/jlb.1010549.
20. Doua DN, Yip L, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood.* 2014;123(4):597-600. doi: 10.1182/blood-2013-09-526707.
21. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-13. doi: 10.1083/jcb.200806072.
22. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-62. doi: 10.1084/jem.20100239.
23. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol.* 2015;11(3):189-91. doi: 10.1038/nchembio.1735.
24. McIlroy DJ, Jarnicki AG, Au GG, Lott N, Smith DW, Hansbro PM, et al. Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J Crit Care.* 2014;29(6):1133.e1-5. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.07.013.
25. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386-93.
26. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):401-7.
27. 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.
28. 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. doi: 10.1189/jlb.0711387.
29. Dubois AV, Gauthier A, Bréa D, Varga F, Diot P, Gauthier F, et al. Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(1):80-6. doi: 10.1165/rcmb.2011-0380OC.
30. Stapels DA, Geisbrecht BV, Rooijackers SH. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:42-8. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.002.
31. Halverson TW, Wilton M, Poon KK, Petri B, Lewenza S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004593. doi: 10.1371/journal.ppat.1004593.
32. Hirsch JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958;108(6):925-44.
33. 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. doi: 10.1073/pnas.0900226106.
34. 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. doi: 10.1016/j.chom.2012.05.015.
35. Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2013;13(2):169-80. doi: 10.1016/j.chom.2013.01.005.
36. Jenne CN, Kubes P. Virus-induced NETs--critical component of host defense or pathogenic mediator? *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004546. doi: 10.1371/journal.ppat.1004546.
37. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: factor folklore? *Blood.* 2012;119(5):1214-6. doi: 10.1182/blood-2011-07-364604.
38. Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff

AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*. 2009;113(25):6419-27. doi: 10.1182/blood-2008-07-171629.

39. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, Grant M, Greenwood H, Livesey A, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*. 2014;13(4):690-8. doi: 10.1111/accel.12222.

40. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1017-25. doi: 10.1038/ni.2987.

41. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG, Thanabalasuriar A, Lee WY, SanzMJ, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*. 2015;6:6673. doi: 10.1038/ncomms7673.

Filipe Fideles D. Andrade é biomédico, mestrando em Genética na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). E-mail: fil.fda@hotmail.com

Cláudia Lopes Penaforte é bióloga, professora adjunta do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário de Belo Horizonte (UniBH), doutora em bioquímica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). E-mail: claudiapenaforte@gmail.com

Clara Araújo Veloso é bióloga, mestre em biomedicina pela Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, doutora em biomedicina pela Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (2010) e pós-doutora em bioquímica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), professora do Centro Universitário de Belo Horizonte (UniBH), líder do grupo de pesquisa em saúde no Centro Universitário de Belo Horizonte (UniBH) e coordenadora do Curso de Estética e Cosmética no Centro Universitário de Belo Horizonte (UniBH). E-mail: clara.veloso@unibh.br