



Nets desempenham papel importante nas doenças crônicas: uma revisão de literatura

Network play important role in chronic diseases: a literature review

Bruna C.S.T. Correia, Pedro H.V. Camargo, Rafaela T. Mendes, Sofia C.P. Lima, Cristiane Tefé-Silva, Karina F. Zoccal*

Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, Brasil.

RESUMO

Introdução: Armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são o resultado da extrusão de diversos componentes pelos neutrófilos, e agem com o intuito de erradicar os patógenos presentes, além de propiciar barreira mecânica, evitando assim, a disseminação de microrganismos. Foi descoberto que doenças crônicas possuem influência significativa dessas NETs, que por mecanismos específicos, produzem efeitos negativos sobre a patogênese. **Métodos:** Revisão bibliográfica utilizando como bases de dados o Google acadêmico, Medline, *Center for Biotechnology Information* (PubMed) e na biblioteca eletrônica *Scientific Electronic Library Online* (SciELO). A busca foi realizada em artigos publicados no período de 2000 a 2019 em português e/ou inglês. **Desenvolvimento:** Foi evidenciado que cada doença em questão é agravada pelas NETs de uma maneira distinta, seja pela exacerbação inflamatória ou pela barreira física, e ainda pode-se considerar a participação de patógenos no processo indutor de estimulação dos neutrófilos. **Conclusão:** O entendimento do processo de formação das NETs, ou seja, a NETose, pode auxiliar em futuros achados que poderiam contribuir para amenizar a injúria causada pelo mecanismo dos neutrófilos, que envolve múltiplas citocinas, grânulos e moléculas de DNA.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias, neutrófilos, NETs, diabetes melito tipo 1, trombose, asma brônquica, fibrose cística.

ABSTRACT

Introduction: Neutrophil extracellular traps (NETs) are the result of extrusion of various components by neutrophils, and act to eradicate the pathogens present, as well as providing mechanical barrier, thus preventing the spread of microorganisms. Chronic diseases have been found to have a significant influence on these NETs, which by specific mechanisms produce negative effects on pathogenesis. **Methods:** Bibliographic review using Google Scholar, Medline, Center for Biotechnology Information (PubMed) and Scientific Electronic Library Online (SciELO) as databases. The search was performed in articles published from 2000 to 2019, in Portuguese and/or English languages. **Development:** It was evidenced that each disease in question is aggravated by NETs in a different way, either by inflammatory exacerbation or physical barrier, and the participation of pathogens in the neutrophil stimulation inducing process can be considered. **Conclusion:** Understanding the process of formation of NETs, ie, NETose, may help future findings that could contribute to mitigate the injury caused by the neutrophil mechanism, which involves multiple cytokines, granules and DNA molecules.

Keywords: Inflammatory diseases, neutrophils, NETs, type 1 diabetes mellitus, thrombosis, bronchial asthma, cystic fibrosis.

*Autor correspondente (corresponding author): Karina F. Zoccal

Centro Universitário Barão de Mauá

Rua Ramos de Azevedo, nº423, Jardim Paulista, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

CEP 14090-180

E-mail: karina_zoccal4@hotmail.com

Recebido (received): 11/02/2020 / Aceito (accepted): 06/05/2020

1. INTRODUÇÃO

Neutrófilos são os mais abundantes leucócitos granulares advindos da mielopoese, cuja produção é estimada de 1 a 2×10^{11} de neutrófilos por dia em indivíduos adultos (BORREGAARD, 2010). Essas células sanguíneas atuam com o papel fundamental

contra microrganismos invasores na primeira linha de defesa do sistema imune inato (SEGAL, 2005). Sua ação baseia-se, principalmente, no mecanismo de fagocitose, associado à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KAPLAN & RADIC, 2012). Além disso, no ano de 2004, foi descoberto a capacidade de atuação

neutrófila contra microrganismos a partir da liberação no meio externo de grânulos (Figura 1). Estes grânulos são compostos por substâncias resultantes da associação de fibras de cromatina descondensada, histonas e proteínas citoplasmáticas do neutrófilo, principalmente elastase neutrófila (NE), catepsina G e azurocina, do complexo azuroma (BRINKMANN, 2004).

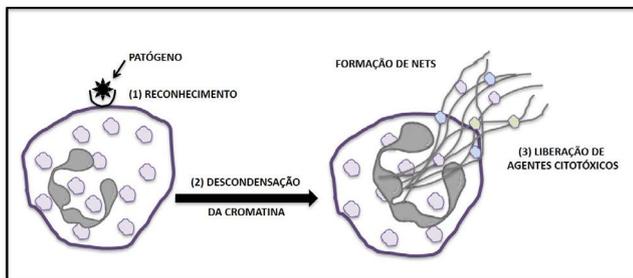


Figura 1. Esquema representativo da formação de NETs. (1) A formação de NETs, por neutrófilos, tem a finalidade de conter e eliminar os patógenos após o reconhecimento, processo conhecido como NETose. (2) As armadilhas são constituídas principalmente pelo material nuclear dos neutrófilos e o conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos. (3) A liberação pode ser estimulada pela presença de microrganismos, citocinas ou complexos antígeno-anticorpo, o que culmina com o aprisionamento e extermínio do agente microbiano.

Uma vez liberadas no meio externo, essas substâncias passam a atuar no aprisionamento e extermínio de agentes patológicos, culminando na morte de neutrófilos para a formação desse mecanismo microbicida, conhecido como armadilha extracelular de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) (ANDRADE *et al.*, 2016). É inquestionável seu potencial benéfico para o extermínio de agentes patológicos. No entanto, a eliminação reduzida ou produção excessiva das NETs estão correlacionadas a danos de células e tecidos do organismo que apresentam forte relação com padrões patológicos, como inflamação, doenças autoimunes e doenças crônicas (ZAWROTNIK & RAPALA-KOZIK, 2013).

As doenças crônicas podem ser causadas pela combinação de diversos fatores, tais como biológicos, socioculturais e comportamentais, e, por se desenvolverem gradativamente, geram necessidade de cuidado contínuo e acompanhamento constante (LYONS & CHAMBERLAIN, 2006). Dentre as doenças, as que possuem maior destaque são: doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias crônicas, câncer e as doenças neuropsiquiátricas (IBGE, 2014). Artigos de revisão recentes destacam a importância dos neutrófilos durante doenças que apresentam aspecto de inflamação crônica. Assim, neste artigo de revisão, abordamos a influência das NETs no desenvolvimento da trombose, diabetes tipo 1, fibrose cística e asma.

2. MÉTODOS

Trata-se de uma Revisão de literatura baseada nas bases de dados: Google Acadêmico, MedLine Center for Biotechnology Information (PubMed), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e EBSCO. Os termos utilizados para a busca foram: Armadilhas Extracelulares de neutrófilos (NETs), asma, doenças respiratórias, diabetes tipo 1, trombose, fibrose cística e

revisão de literatura. Os mesmos termos na língua inglesa, também foram utilizados: *neutrophil extracellular traps (NETs)*, *asthma*, *respiratory diseases*, *type 1 diabetes*, *thrombosis*, *cystic fibrosis* e *literary review*. Sendo uma pesquisa que tem por objeto analisar através da literatura pré-existente, a relação básica das NETs com as doenças crônicas: asma, trombose, diabetes e fibrose cística, observando como essa interação ocorre e suas eventuais consequências para o indivíduo. No total, 63 artigos foram utilizados, de acordo com um critério de inclusão pré-definido: artigos publicados entre 2000 até 2019.

3. NETs VERSUS DOENÇAS CRÔNICAS

3.1. NETs e diabetes Mellito tipo 1

Diabetes é um conjunto de doenças caracterizadas por uma disfunção no metabolismo da glicose que leva ao quadro de hiperglicemia crônica, cuja sintomatologia clássica é expressa a partir da manifestação de perda de peso, alterações na visão, aumento do consumo hídrico e alimentar, e elevação da frequência miccional (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). Classicamente, são caracterizados dois tipos de Diabetes melito: o tipo 1, também conhecido por “diabetes insulina-dependente”, cuja origem advém de um ataque autoimune do organismo contra as células produtoras de insulina presentes nas ilhotas pancreáticas; e o tipo 2, cuja causa baseia-se na perda da sensibilidade dos receptores alvos de insulina, acarretando na resistência ao hormônio (ZACCARDI *et al.*, 2015).

Estima-se que a população portadora de Diabetes tipo 1 (DT1) representa aproximadamente 5-10% dos casos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). O quadro clínico da DT1 é resultado da destruição autoimune mediada, principalmente, por anticorpos específicos às células β -pancreáticas, produtores de insulina (OZOUGWU, 2013), e de um intenso infiltrado linfocitário, o qual possui papel expressivo na patogênese da doença. Atualmente, pesquisas ao redor do mundo têm mostrado relações consistentes entre a atuação de NETs e a patogênese da doença DT1 (WANG *et al.*, 2014; QIN *et al.*, 2016; YOU *et al.*, 2019), fenômeno que pode ampliar a definição de autoimunidade na patogênese do Diabetes.

Sabe-se que as NETs são, principalmente, formadas a partir de um estímulo patológico, fisiológico ou mesmo farmacológico afim de aprisionarem e eliminarem microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2016). No entanto, estudos demonstraram que neutrófilos coletados de pacientes saudáveis, estimulados *in vitro*, com diferentes concentrações de glicose ou manitol, apresentaram quadro de hiperglicemia quando comparados ao grupo controle, o que representa um fator estimulante para formação das NETs, contribuindo para a NETose (MENEGAZZO *et al.*, 2014). NETose é o termo utilizado para o padrão específico de morte celular que culmina na formação da NET (ANDRADE *et al.*, 2016).

Estudos com pacientes portadores de DT1 demonstraram que há uma diminuição na contagem sérica de neutrófilos e um aumento significativo, principalmente em indivíduos diagnosticados dentro do período de um ano, nos níveis de elastase neutrófila (NE) e proteinase 3 (PR3), as principais serina-proteases

neutrofílicas. A partir dos dados apresentados, foi proposto que essa redução na contagem de neutrófilos junto ao aumento de NE e PR3 estão ligadas ao aumento do processo de NETose, demonstrado a partir da dosagem de complexos mieloperoxidase (MPO)-DNA circulantes que se apresentaram em níveis altos. Logo, os dados obtidos correlacionam-se diretamente com a patogenia da autoimunidade apresentada contra células β pancreáticas, além de sugerir um possível uso da contagem de NE e PR3 como método diagnóstico precoce para DT1 (WANG *et al.*, 2014).

Estudos realizados com camundongos do tipo NOD (non-obese diabetic), demonstraram correlação entre o aparecimento de infiltrado de células da imunidade inata nas ilhotas pancreáticas em suas primeiras semanas de vida (dentre elas neutrófilos, células dendríticas plasmocitoides (pDCs) e linfócitos B), com a morte fisiológica de células B pancreáticas (DIANA *et al.*, 2012). Sabe-se que a morte fisiológica dessas células estimula a produção de imunocomplexos, os quais são potencializados a partir da liberação de produtos neutrofílicos que induzem a produção de interferon ($\text{IFN-}\alpha$). A ação dessa citocina na patogênese do DT1 cria um ambiente propício para a instalação de uma resposta autoimune e favorável ao desenvolvimento da doença (DIANA *et al.*, 2012).

Assim, sugere-se uma possível correlação da patogênese do DT1 e a ação da liberação dos compostos pertencentes às NETs. Entretanto, mais estudos são necessários para o entendimento do mecanismo desta correlação.

3.2. NETs e Trombose

O sistema hemostático é composto por plaquetas, vasos, proteínas de coagulação do sangue, anticoagulantes naturais e os eventos da fibrinólise (FRANCO, 2001). Este sistema é responsável por manter o sangue em estado fluido, livre de coágulos nos vasos normais, e por produzir um tampão hemostático em vasos lesados (COTRAN, 2000). Assim, a hemostasia é um processo fisiológico, entretanto, a parte patológica, é a trombose, a qual é causada por coágulos sanguíneos que atrapalham o fluxo normal dentro das veias e artérias, acarretando graves patologias como tromboembolismo venoso, acidente vascular cerebral isquêmico e doenças cardíacas isquêmicas (LOZANO *et al.*, 2012). No processo de hemostasia e trombose três componentes estão envolvidos: a parede vascular (principalmente o endotélio), as plaquetas e a cascata de coagulação (KUMAR *et al.*, 2013).

O conceito de trombose imune descreve a interação entre o sistema imune inato e ativação da coagulação (MASSBERG *et al.*, 2010). As NETs estão sendo identificadas como participantes na formação de coágulos sanguíneos e trombose, tendo sido encontradas em diferentes configurações, como na trombose venosa profunda e infarto do miocárdio (MARTINOD & WAGNER, 2013). Um dos principais mecanismos pelo qual as NETs promovem a trombose é pela formação de um esqueleto para a adesão de plaquetas, glóbulos vermelhos e moléculas de adesão plaquetária, como fibronectina, fibrinogênio e fator de von Willebrand (FUCHS *et al.*, 2010). Este esqueleto não somente forma

uma base estrutural, como também, contribuem para a ativação plaquetária e coagulação do sangue (XU *et al.*, 2009).

As principais alterações que contribuem para a formação do trombo, chamadas tríade de Virchow, incluem: estase (fluxo sanguíneo vascular baixo), dano endotelial ou da parede do vaso e hipercoagulabilidade (ZAWROTNIAK & RAPALA-KOZIK, 2013). O endotélio ativado, por exemplo, por uma hipóxia local, libera o fator de von Willebrand, que é necessário para o recrutamento e adesão de plaquetas (BRILL *et al.*, 2011). Além disso, quando ativo libera compostos que ao entrar em contato com os neutrófilos estimulam a NETose, processo de morte do neutrófilo pela formação de NETs (GUPTA *et al.*, 2010).

Sabe-se que a trombose também pode ser iniciada pela liberação do fator tecidual, e por citocinas produzidas durante inflamações associadas à infecções, doenças autoimunes e câncer (LINE, 2001; FUCHS *et al.*, 2012). Interleucina (IL)-8 e as EROs liberados pelas células endoteliais podem recrutar e dar gatilho para os neutrófilos formar NETs, que por sua vez ativam e danificam o endotélio pela ligação das histonas (GUPTA *et al.*, 2010). Dados recentes da literatura relataram que, em camundongos, as histonas (H4) liberadas pelas NETs induziram a agregação de plaquetas, e estas junto ao DNA extracelular foram identificadas por causar uma regulação positiva de vários fatores de coagulação, explicando o efeito pró-trombótico destes componentes das NETs (REYES GARCÍA *et al.*, 2019).

Outro adjuvante é o fator tecidual, que pode ser produzido por neutrófilos e expelido para a veia durante a formação das NETs, evidenciando que a NETose promove uma interface entre inflamação e trombose (VON BRUHL *et al.*, 2012; FUCHS *et al.*, 2012). Além disso, outra forma de contribuição das NETs na formação de trombos é pela captura e ativação de plaquetas (MA & KUBES, 2008). Deste modo, foi evidenciado que as NETs possuem relevância na interação inflamação-coagulação (BORISSOFF & CATE, 2011). Este conhecimento é importante, visto que a trombose ainda é um dos maiores riscos para a saúde no mundo, sendo relevante para a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antitrombóticas (LARIDAN *et al.*, 2019).

3.3. NETs e Asma Brônquica

A asma é caracterizada por obstrução do fluxo aéreo principalmente devido a broncoespasmos, inflamação crônica e remodelação da parede das vias aéreas (VARGAS *et al.*, 2017). A asma resulta de complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e socioeconômicos e representa um importante problema de Saúde Pública Mundial (SOUZA *et al.*, 2019). É uma patologia reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Um quarto aspecto que pode ser incluído nesta definição diz respeito às alterações anatomo-funcionais da via aérea inferior, chamadas em conjunto de remodelamento brônquico, e que estão diretamente relacionadas à inflamação crônica da via aérea e ao prognóstico da doença (SILVA, 2008).

É uma das doenças crônicas mais comuns da infância

e adolescência (SOUZA *et al.*, 2019), e anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (2,3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (CANÇADO, 2018; SOUZA *et al.*, 2019). O estudo multicêntrico ISAAC (International study of asthma and allergies in childhood) mostrou que o Brasil se encontra em 8º lugar com uma prevalência média de 13% da população (CANÇADO, 2018).

A principal característica fisiopatogênica da asma é a inflamação brônquica, resultante de um amplo e complexo espectro de interações entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006). Na asma alérgica essa inflamação é caracterizada pela sensibilização da imunoglobulina E (IgE), controlado por IL-4 (TAKETOMI *et al.*, 2005). No primeiro contato com o alérgeno, a célula apresentadora de antígeno (APC) apresenta-o via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) aos Linfócitos T auxiliares, que sintetizam citocinas, promovendo a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE específica para o alérgeno, com o qual o organismo teve contato. No segundo contato com o mesmo alérgeno, ocorre a interação com as IgE presentes na superfície dos mastócitos e basófilos através de uma reação antígeno-anticorpo, provocando a degranulação destas células e a liberação de mediadores inflamatórios (TODO-BOM & PINTO, 2006).

Assim no processo asmático, os mastócitos são controlados pela síntese de IL-9 (TAKETOMI *et al.*, 2005) e liberam principalmente histaminas, leucotrienos, triptase e prostaglandinas, (TODO-BOM & PINTO, 2006). Os macrófagos produzem citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e óxido nítrico; e os linfócitos T secretam IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, fator de crescimento de colônia de granulócitos, que induzem o recrutamento de eosinófilos (TAKETOMI *et al.*, 2005). Resultante a este processo, surgem as lesões e alterações na integridade epitelial, no tônus da via aérea, na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (BRASIL, 2006), resultando em contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória, podendo provocar broncoespasmo e edema (TODO-BOM & PINTO, 2006).

Como já discutido anteriormente, os neutrófilos são atores-chave na morte microbiana, pois atuam como a primeira linha de defesa contra os microrganismos através da fagocitose, liberação de EROs, degranulação e pelas NETs (PORTO & STEIN, 2016). Assim, as armadilhas de DNA podem ser produzidas como ferramentas eficientes para combater agentes infecciosos que potencialmente invadem os brônquios após danos às células epiteliais. Entretanto, ainda é possível que as próprias armadilhas de DNA contribuam para piorar a característica de dano celular epitelial da asma (SIMON *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstraram que as NETs são participantes fundamentais na estimulação das células epiteliais das vias aéreas (AECs) para produzir auto-anticorpos como: anticorpos anti-citoqueratina (CK) 18, anti-CK19 e anti- α -enolase (CHOI *et al.*, 2017). Além

disso, foi demonstrado que as NETs induzem a morte e descolamento de células epiteliais das vias aéreas, por mecanismo de degradação das proteínas de junção, como ocludina e claudina-1, diminuindo a expressão celular das mesmas, dado que são proteínas importantes para manter a integridade epitelial (PHAM *et al.*, 2016). Outro fator que foi demonstrado por contribuir na patogênese da asma foi a produção da citocina IL-8 induzido pelas NETs, sugerindo assim, efeito pró-inflamatório das mesmas (PHAM *et al.*, 2016).

Estes dados demonstram que os neutrófilos ativados produzem NETs, o que poderia contribuir para danos epiteliais das vias aéreas, indução pró-inflamatória por meio de citocinas e produção de auto-antígenos, especialmente na asma severa, e assim um maior dano tecidual, e por conseguinte uma piora no quadro sintomático (CHOI *et al.*, 2017).

3.4. NETs e Fibrose Cística

Fibrose cística (FC), Mucoviscidose ou Doença do Beijo Salgado são todas denominações para a mesma doença (INSTITUTO BRASILEIRO DE ATENÇÃO À FIBROSE CÍSTICA, 2010). Curiosamente o último nome citado revela muito sobre uma característica da enfermidade, pois acreditava-se que a criança com o suor salgado estava “enfeitada”. A menção a este termo relacionado ao beijo salgado na testa ocorreu em mais de uma fonte: em um dicionário suíço-alemão, e em um almanaque de músicas suíças, sendo que este previa a morte rápida da criança com essa condição (LITTLEWOOD, 2007). De fato, “é a doença genética grave mais comum na infância” (BRASIL, 2018). Para exemplificar sua gravidade, no Brasil, a sobrevivência mediana dos pacientes avaliada pelo método de Cox de 2009 a 2017 situa-se entre 43,8 e 54,9 anos (REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA, 2017). Contudo, a doença apresenta melhora do prognóstico nos últimos anos, devido aos programas de acompanhamento neonatal (BRASIL, 2017).

A FC é definida como uma doença crônica e genética de padrão autossômico recessivo. É discutível qual seria a vantagem evolutiva do gene mutante, acredita-se que seja protetor contra a *Salmonella* e febre tifoide. Há também outra vertente que explica sua existência devido à cólera, porém não há um consenso, mesmo que ambas sejam plausíveis (BREDEMEIER, 2005). A mutação ocorre no gene Regulador Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR), que codifica proteína de mesmo nome, responsável por mediar o transporte de íons bicarbonato (HCO₃⁻) e cloreto (Cl⁻) nas células epiteliais do pulmão, glândulas sudoríparas, pâncreas e trato digestivo (ROUT-PITT *et al.*, 2018; LAW & GRAY, 2017). O espessamento do muco nos pulmões contribui para a colonização por microrganismos patogênicos, como: *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esse espessamento é causado pela diminuição do líquido da superfície das vias aéreas e consequentemente pela diminuição da atividade de limpeza mucociliar. Os agregados de mucinas, MUC5AC, MUC5B e MUC2 presentes nos cílios atuam atraindo água e armazenando-a, assim, quando se faz necessário, liberam o conteúdo hídrico no espaço periciliar, o hidratando. O canal feito pela CFTR

além de controlar indiretamente o sódio local, permite a secreção de Cl⁻, regulando a água. Contudo, na FC, a falta da proteína inviabiliza o processo fisiológico normal, com acentuada absorção de sódio e água, o muco torna-se viscoso, favorecendo a permanência de patógenos e a inflamação crônica, comprometendo a função pulmonar (CANTIN *et al.*, 2015; ROUT-PITT *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-ALEMÁN *et al.*, 2017).

Os neutrófilos, em resposta às quimiocinas e citocinas (IL1- β , c5a), exercem suas atividades para erradicar os patógenos presentes, dessa forma lançam mão de EROs, grânulos citotóxicos e NETs, provocando injúria tecidual. Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares recrutados primariamente em inflamações e infecções microbianas. Ao receber estímulo, eles liberam um agregado de DNA, MPO, NE e histonas, denominados NETs, que aprisionam os patógenos presentes (KHAN *et al.*, 2019).

A NE é um grânulo azurófilo, que degrada proteínas fagocitadas, elastina e colágeno nas vias aéreas. Está envolvida na fisiopatologia da FC: acumulando muco nas vias aéreas por ativação de canais *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) e Epitelial Na⁺ Channel (ENaC) e degradando defesas antimicrobianas, favorecendo a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (GIFFORD & CHALMERS, 2014). Foi visto também que este grânulo está relacionado ao agravamento da lesão pulmonar em pacientes com fibrose cística quando associado às histonas. Estas estão associadas com lesão pulmonar aguda pós-trauma em ratos. Elas se ligam aos fosfolípidios da membrana, levando a sua ruptura, que culmina em influxo de cálcio (Ca²⁺), inculcem produção de NETs e liberação de MPO. Além das histonas e NE, a calprotectina também é um agente pró-inflamatório albergado pela trama de DNA das NETs e antifúngico contra *Candida albicans* (LAW & GRAY, 2017; BRANZK & PAPAYANNOPOULOS, 2013). Os componentes das NETs produzem lesão ao endotélio e tecido conjuntivo, sendo demonstrado que aparentemente o DNA anormalmente elevado na saliva associado ao aglomerado de NETs na FC é fator contribuinte para a oclusão das vias respiratórias, além de tornar o muco mais espesso e desidratado, fator importante da fisiopatologia da FC (MARTÍNEZ-ALEMÁN *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2019). Aditivamente, Gray e colaboradores (2017) demonstraram que as NETs são produzidas em maiores quantidades pelos neutrófilos na FC em relação aos controles saudáveis. Isto ocorre porque a ausência funcional do CFTR está relacionada ao retardo de apoptose, permitindo sobrevivência prolongada aos neutrófilos (ditos com fenótipo pró-sobrevivência) e consequentemente a maior produção das NETs.

Como citado anteriormente, alguns microrganismos desempenham papéis importantes na patogenia da doença. Nosso organismo lança mão de mecanismos para nos proteger, como macrófagos alveolares, a presença de IgA e a atividade mucociliar. Apesar disso, as alterações sofridas na FC facilitam a colonização por patógenos, que inevitavelmente precisam se adaptar, proliferando e evadindo o sistema imune do hospedeiro (MARTÍNEZ-ALEMÁN *et al.*, 2017; CULLEN; MCCLEAN, 2015; EISELE *et al.*, 2011). A *P. aeruginosa* é o principal

patógeno das vias aéreas dos pacientes com FC, sendo uma bactéria gram-negativa oportunista, que afeta principalmente imunocomprometidos (RADA, 2017a). É sugerido que esta bactéria auxilia na quebra da tolerância ao BPI (peptídeo com função antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, armazenado em grânulos azurófilos, mas também presente na membrana celular de neutrófilos e nos fios de DNA de NETs), sendo que o anti-BPI correlaciona com a diminuição da função pulmonar (SKOPELJA-GARDNER *et al.*, 2016; LAW & GRAY, 2017). Foi evidenciado que principalmente a forma flagelada da *P. aeruginosa* é capaz de induzir a formação de NETs, apesar da forma imóvel, seja por não possuir flagelo, ou por ele não ser funcional, também ser indutora, mesmo que de maneira fraca. A flagelina isolada não é capaz de promover a formação de NETs pelos neutrófilos humanos, embora os locus gênicos motAB e motCD de genes motores sejam necessários para a indução máxima (RADA, 2017b). A indução das NETs também pode ser ocasionada por mediadores lipídicos, por exemplo o eicosanoide chamado Hepoxilina A3, produzido por células epiteliais do pulmão em resposta a infecção bacteriana, que age como um mediador para a migração dos neutrófilos (FLOYD *et al.*, 2016; DOUDA *et al.*, 2015; HURLEY *et al.*, 2004; PAZOS *et al.*, 2014). A eliminação da *P. aeruginosa* é feita pela liberação de NETs, mas principalmente pela fagocitose dos neutrófilos, porém essas células na FC são incapazes de erradicar a *P. aeruginosa*, e ainda contribuem para a lesão pulmonar. Para evitar ser reconhecida pelo sistema imunológico, essa bactéria na infecção crônica se adapta: reduz a expressão do flagelo, realiza conversão mucoide (auxilia na evasão aos macrófagos e previne a liberação de NETs) e forma biofilmes, estrutura tridimensional dinâmica circundada por neutrófilos, que permite evasão à fagocitose dos neutrófilos (RADA, 2017a; MULCAHY *et al.*, 2008).

Estudos foram dirigidos de maneira a tentar diminuir a inflamação da FC, buscando novas ferramentas terapêuticas para a mucoviscidose. Infelizmente inibidores de proteases são ineficazes provavelmente devido a uma ligação com as NETs. Já os anticorpos anti-histonas induzem a autoimunidade e autoanticorpos. A atividade de elastases são exacerbadas com DNase, mas que pode ser revertida com inibidores exógenos da elastase. Outros estudos enfatizam a perspectiva dos patógenos no curso da doença, objetivando trabalhar na questão dos biofilmes da *P. aeruginosa*, embora os resultados demonstrem efeitos adversos significativos com pequena melhora dos sintomas (DUBOIS *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2019; GREENE & MCELVANEY, 2009).

4. CONCLUSÃO

A NETose difere de outros mecanismos de morte celular pela liberação de uma treliça, composta por DNA associado a proteínas. Essas NETs são compostas de proteínas derivadas de grânulos com atividade microbicida, sendo encontradas em uma variedade de condições, como infecção, malignidade, aterosclerose e doenças autoimunes. Em resumo, as NETs são eficazes contra uma variedade de patógenos e parecem desempenhar um papel fundamental para aprisionar

fisicamente micróbios para impedir a disseminação microbiana (BRANZK & PAPAYANNOPOULOS, 2013). Entretanto, a desregulação da formação e depuração dessas armadilhas neutrofílicas parecem ter efeitos prejudiciais. Estudos sugerem que um desequilíbrio entre NETose e a degradação das NETs podem estar associadas a doenças inflamatória crônica, como por exemplo, DM1, trombose, asma e fibrose cística (Figura 2).

Assim, uma compreensão dos mecanismos moleculares e a dinâmica espaço-temporal que regulam a liberação de NETs nos contextos de doenças inflamatórias, pode pavimentar o caminho para o

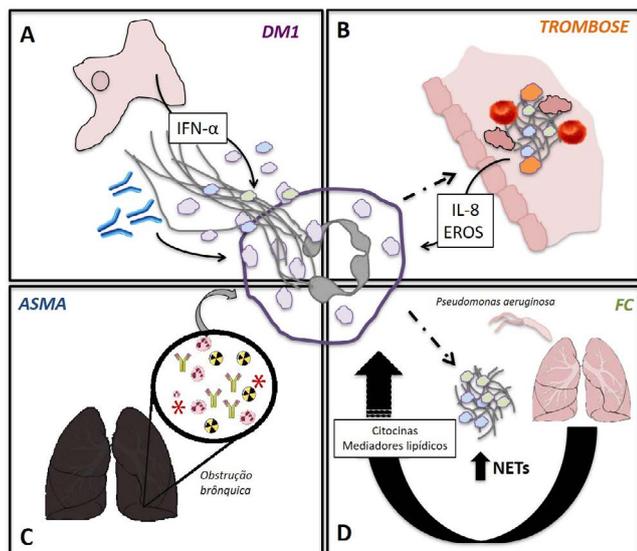


Figura 2. Influência das NETs nas doenças crônicas. (A) Estudos com camundongos tipo NOD sugerem que a morte de células β pancreáticas estimula a produção de imunocomplexos, os quais são potencializados a partir da liberação de produtos neutrofílicos (NETs) que induzem a produção de interferon ($\text{IFN-}\alpha$). A ação dessa citocina cria um ambiente propício para a instalação de uma resposta autoimune e desenvolvimento do Diabetes melito tipo 1 (DM1). **(B)** Danos no endotélio podem ser ativados culminando na liberação do fator de von Willebrand e outros fatores, o que leva ao recrutamento e adesão de plaquetas. Por consequência, as plaquetas ativam os neutrófilos e outros componentes, como IL-8 e EROs, desencadeando a NETose. Os componentes das NETs, geram agregação plaquetária e regulação positivamente de vários fatores da coagulação, levando a formação de um coágulo (trombose). **(C)** Com o recrutamento dos neutrófilos, devido aos fatores quimioatraentes, ocorre a formação das NETs, estimulando a produção de auto-anticorpos e mediadores inflamatórios, como citocinas, o que leva o agravamento do processo asmático, culminando na obstrução das vias aéreas. **(D)** *Pseudomonas aeruginosa* é um importante agente etiológico no processo inflamatório da Fibrose cística (FC), induzindo a migração de neutrófilos pelas células epiteliais do pulmão, com aumento de NETs via a Hepoxilina A3 (HxA3, mediador lipídico). Essas células, através da ativação da NETose, produção de NETs, e liberação de moléculas, como anafilatoxina C5a, a quimiocina IL-8 e o eicosanoide LTB4, agravam a patologia, pois participam da integração de uma cascata de recrutamento de neutrófilos. desenvolvimento de novas terapêuticas elucidadas na patogênese de inúmeras doenças.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existe qualquer conflito

de interesse.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 33, n. 1, p.62-69, 2009.
- Andrade, F.F.D.; Penaforte, C.L.; Veloso, C.A. Mecanismos Moleculares De Formação Das Armadilhas Extracelulares Dos Neutrófilos E Seu Papel Na Imunidade Inata. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 23, n. 2, p.03-4, 18 jul. 2016. Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto - FAMERP.
- Brasil. Ministério da Saúde. Biblioteca virtual em saúde. Fibrose Cística, 2018. Disponível em: <<http://bvsm.sau.gov.br/dicas-em-saude/2675-fibrose-cistica>>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- Brasil. Ministério Da Saúde. Fibrose Cística (FC). 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/fibrose-cistica-fc>>. Acesso em: 28 jun. 2019.
- Borissoff, J. I.; Cate, H.T. from neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, v. 9, n. 9, p.1791-1794, 2011.
- Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, v. 33, p.657-670, 2010.
- Branzk, N.; Papayannopoulos, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars In Immunopathology*, v. 35, p.513-530, 2013.
- Bredemeier, J. A Experiência de Crescer com Fibrose Cística: Investigações sobre Qualidade de Vida. 2005. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Psicologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- Brill, A.; Fuchs, T.; Chauhan, A.K.; Yang, J.J.; De Meyer, S.F.; Köllnberger, M.; Wakefield, T.; Lämmle, B.; Massberg, S.; Wagner, D.D. Von willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*, v. 117, p. 1400–1407, 2011.
- Brinkmann, V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, v. 303, p.1532-1535, 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
- Cançado, J.Ed.D.; Penha, M.; Gupta, S.; Li, V.W.; Julian, G.S.; Moreira, E.S. Respira project: Humanistic and economic burden of asthma in Brazil. *Journal of Asthma*, v. 56, p. 244-251, 2018.
- Cantin, A.M.; Hartl, D.; Konstan, M.W.; Chmiel, J.F. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal Of Cystic Fibrosis*, v. 14, p.419-430, 2015.
- Choi, Y.; Pham, L.D.; Lee D.-H.; Ban G.-Y.; Lee, J.-H.; Kim, S.-H.; Park, H.-S. Neutrophil Extracellular DNA Traps Induce Autoantigen Production by Airway Epithelial Cells. *Mediators Of Inflammation*, v. 2017, p.1-7, 2017.
- Contran R.S. & Mitchel R.N. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional, 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- Cullen, L.; Mcclean, S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens*, [s.l.], v. 4, p.66-89, 2015.
- Diana, J.; Simoni, Y.; Furio L.; Beaudoin L.; Agerberth B.; Barrat F.; Lehuen A. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, v. 19, p.65-73, 2012.

- Douda, D.; Grasemann, H.; Pace-Asciak, C.; Palaniyar, N. A Lipid Mediator Hepoxilin A3 Is a Natural Inducer of Neutrophil Extracellular Traps in Human Neutrophils. *Mediators Of Inflammation*, v. 2015, p.1-7, 2015.
- Dubois, A.V.; Gauthier, A.; Bréa, D.; Varaigne, F.; Diot, P.; Gauthier, F.; Attucci S. Influence of DNA on the Activities and Inhibition of Neutrophil Serine Proteases in Cystic Fibrosis Sputum. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, v. 47, p.80-86, 2012.
- Eisele, N.A.; Anderson, D.M. Host Defense and the Airway Epithelium: Frontline Responses That Protect against Bacterial Invasion and Pneumonia. *Journal Of Pathogens*, v. 2011, p.1-16, 2011.
- Floyd, M.; Winn, M.; Cullen, C.; Sil, P.; Chassaing, B.; Yoo, D.G.; Gewirtz, A.T.; Goldberg, J.B.; McCarter, L.L.; Rada, B. Swimming Motility Mediates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps Induced by Flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos Pathogens*, v. 12, p.1-32, 2016.
- Franco, R.F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. *Medicina*, Ribeirão Preto, 2001.
- Fuchs, T.A.; Brill, A.; Wagner, D.D. Neutrophil extracellular trap (net) impact on deep vein thrombosis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biol*, v. 32, p. 1777-1783, 2012.
- Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; *et al.* Extracellular dna traps promote thrombosis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 107, p.15880-15885, 2010.
- Gifford, A.M.; Chalmers, J.D. The role of neutrophils in cystic fibrosis. *Current Opinion In Hematology*, v. 21, p.16-22, 2014. Gray, R.D.; Hardisty, G.; Regan, K.H.; Smith, M.; Robb, C.T.; Duffin, R.; Mackellar, A.; Felton, J.M.; Paemka, L.; McCullagh, B.N.; Lucas, C.D.; Dorward, D.A.; McKone, E. F.; Cooke, G.; Donnelly, S.C.; Singh, P.K.; Stoltz, D.A.; Haslett, C.; McCray, P.B.; Whyte, M.K.B.; Rossi, A.G.; Davidson, D.J. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax*, v. 73, p.134-144, 2017.
- Greene, C.M; Mcelvaney, N.G. Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *British Journal Of Pharmacology*, v. 158, n. 4, p.1048-1058, 2009.
- Gupta, A.K.; Joshi, M.B.; Philippova, M.; Erne, P.; Hasler, P.; Hahn, S.; Resink, T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to netosis-mediated cell death. *FEBS Lett*, v. 584, p. 3193-3197, 2010.
- Hurley, B.P.; Siccardi, D.; Mrsny R.J.; McCormick, B.A. Polymorphonuclear Cell Transmigration Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Requires the Eicosanoid Hepoxilin A3. *The Journal Of Immunology*, v. 173, p.5712-5720, 2004.
- IBGE. Ministério da Saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. (2014). Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro. Recuperado de <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>
- Instituto Brasileiro de atenção à fibrose cística. Doença do Suor Salgado? Mucoviscidose? Fibrose Cística? Qual é o nome certo? Disponível em: <<http://unidospelavida.org.br/doenca-do-suor-salgado-mucoviscidose-fibrose-cistica-qual-e-o-nome-certo-afinal/>>. Acesso em: 19 maio 2019.
- IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J. bras. pneumol.*, São Paulo , v. 32, supl. 7, p. S447-S474, Nov. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132006001100002&lng=en&nrm=iso>. access on 06 Oct. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006001100002>.
- Kaplan, M. J.; Radic, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal Of Immunology*, v. 189, p. 2689-2695, 2012.
- Khan, M.A.; Ali, Z.S.; Swezey, N.; Grasemann, H.; Palaniyar, N. Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease from Childhood to Adulthood: Neutrophils, Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation, and NET Degradation. *Genes*, v. 10, p. 183-205, 2019.
- Kumar, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. Distúrbios hemodinâmicos, tromboembolismo e choque: hemostasia e trombose. In: KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. *Robbins Patologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 3, p. 75-98. ISBN 978-85-352-6294-0.
- Laridan, E.; Martinod, K.; Meyer, S.de. Neutrophil extracellular traps in arterial and venous thrombosis. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*, v. 45, p.086-093, 2019.
- Law, S.M.; Gray, R.D. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *Journal Of Inflammation*, v. 14, p.1-8, 2017.
- Line, B.R. pathophysiology and diagnosis of deep venous thrombosis. *Seminars Nuclear Med*, v. 31, p. 90-101, 2001.
- Littlewood, J.M.. History of Cystic Fibrosis. In: HODSON, Margaret E.; BUSH, Andrew; GEDDES, Duncan M. *Cystic Fibrosis: Third Edition*. 3. ed. London: Hodder Arnold,. Cap. 1. p. 3-20, 2007.
- Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet*, v. 380, p.2095-2128, 2012.
- Lyons, A. C., & Chamberlain, K. *Health Psychology: A Critical Introduction*. New York: United States of America by Cambridge University Press., 2006.
- Ma, A.; C, Kubes, P. Platelets Neutrophils And Neutrophil Extracel-Lular Traps (Nets) In Sepsis. *J Thrombosis Haemostasis*, v. 6, p. 415-420, 2008.
- Martínez-Alemán, S.R.; Campos-García, L.; Palma-Nicolas, J.P.; Hernández-Bello, R.; González, G.M.; Sánchez-González, A. Understanding the Entanglement: Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cystic Fibrosis. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, v. 7, p.1-7, 2017.
- Martinod, K.; Wagner, D. D.. THROMBOSIS: TANGLED UP IN NETS. *Blood*, v. 123, p.2768-2776, 2013.
- Massberg, S; Grahl L; von Bruehl ML; Manukyan D; Pfeiler S *et al.* Reciprocal Coupling Of Coagulation And Innate Immunity Via Neutrophil Serine Proteases. *Nature Medicine*, v. 16, p.887-896, 2010.
- Menegazzo, L.; Ciciliot S.; Poncina N.; Mazzucato M.; Persano M.; Bonora B.; Albiero M.; Kreutzenberg S. V.; Avogaro A.; Fadini G. P. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*, v. 52, p.497-503, 2014.
- Mulcahy, H.; Charron-Mazenod, L.; Lewenza, S. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Plos Pathogens*, v. 4, p.1-12, 2008.

- Ozougwu, O. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal Of Physiology And Pathophysiology*, v. 4, p.46-57, 2013.
- Pazos, M.A.; Pirzai, W.; Yonker, L.M.; Morisseau C.; Gronert, K.; Hurlley, B.P. Distinct Cellular Sources of Hepoxilin A3 and Leukotriene B4 Are Used To Coordinate Bacterial-Induced Neutrophil Transepithelial Migration. *The Journal Of Immunology*, v. 194, p.1304-1315, 2014.
- Pham, D.L.; Ban, G.-Y.; Kim, S.-H.; Shin, Y. S.; Ye, Y.-M.; Chawae, Y.-J.; Park, H.-S. Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 47, p.57-70, 2016.
- Porto, B.N.; Stein, R.T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing?. *Frontiers In Immunology*, v. 7, p.47-51, 2016.
- Qin, J.; Fu, S.; Speake, C.; Greenbaum, C.J.; Odegard, J.M. NETosis-associated serum biomarkers are reduced in type 1 diabetes in association with neutrophil count. *Clin Exp Immunol.*, v. 184, p. 318-22, 2016.
- Rada, B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Pathogens*, v. 6, p.1-24, 2017a.
- Rada, B. Neutrophil extracellular trap release driven by bacterial motility: Relevance to cystic fibrosis lung disease. *Communicative & Integrative Biology*, v. 10, p.1-4, 2017b.
- Registro brasileiro de fibrose cística 2017. [s. I]: Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística, 2017.
- Reyes-García A. M.; Aroca A.; Arroyo A.b.; Garcia-Barbera N.; Vicente V.; González-Conejero R.; Martínez C. Neutrophil extracellular trap components increase the expression of coagulation factors. *Biomedical Reports*, p.195-201, 2019.
- Rout-Pitt, N.; Farrow, N.; Parsons, D.; Donnelley, M. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology. *Respiratory Research*, v. 19, p.1-11, 2018.
- Segal, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review Of Immunology*, v. 23, p.197-223, 2005.
- Silva, E.C.F. Asma brônquica. *Brazilian Journal Of Health And Biomedical Science*, v. 2, p.33-57, 2008.
- Simon, D.; Simon, H.-U.; Yousefi, S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy*, v. 68, p. 409-416, 2013.
- Skopelja-Gardner, S.; Hamilton, J.; Jones, J.D.; Yang, M.L.; Mamula, M.J.; Ashare, A.; Gifford, A.H.; Rigby, W.F.C. The role of neutrophil extracellular traps in cystic fibrosis autoimmunity. *JCI Insight*, v.1, p. 1-12, 2016.
- Souza, E.C.O.; Santos, E.S.; Rosa, A.M.; Botelho, C. ARTIGO. Varredura espaço-temporal para identificação de áreas de risco para hospitalização de crianças por asma em Mato Grosso. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 22, p.183-191, 2019.
- Taketomi, E. A.; Marra, S.M.G.; Segundo, G.R.S. Fisioterapia em Asma Efeito na Função Pulmonar e em Parâmetros Imunológicos. *Fitness & Performance Journal*, Rio de Janeiro, v. 4, p.97-100, 2005.
- Todo-Bom, A.; Pinto, A.M. Fisiopatologia da asma grave. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, Coimbra, v. 2, n. 4, p.43-48, 15 set. 2006. Mensal. Disponível em: <[https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/20230/1/Fisiopatologia%20da%20Asma%20Grave%20\(RPIA2006\).pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/20230/1/Fisiopatologia%20da%20Asma%20Grave%20(RPIA2006).pdf)>. Acesso em: 01 set. 2019.
- Vargas, A.; Boivin, R.; Cano, R.B.P.; Murcia, Y.; Bazin, I.; Lavoie, J.-P. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respiratory Research*, v. 18, p.56-63, 2017.
- Von Brühl, M.L.; Stark, K.; Steinhart, A.; Chandraratne, S.; Konrad, I.; Lorenz, M.; Khandoga, A.; Tirniceriu, A.; Coletti, R.; Köllnberger, M.; *et al.* Monocytes neutrophils and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, v 209, p. 819–835, 2012.
- Wang, Y.; Xiao Y.; Zhong L.; Ye D.; Zhang J.; Tu Y.; Bornstein S. R.; Zhou Z.; Lam K. S.L.; Xu A. Increased Neutrophil Elastase and Proteinase 3 and Augmented NETosis Are Closely Associated With -Cell Autoimmunity in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 63, p.4239-4248, 2014.
- Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C.T.; *et al.* Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, v. 15, p.1318-1321, 2009.
- You, Q.; He, D.M.; Shu, G.F.; Cao, B.; Xia, Y.Q.; Xing, Y.; Ni, M.; Chen, J.F.; Shi, S.L.; Gu, H.F., *et al.* Increased formation of neutrophil extracellular traps is associated with gut leakage in patients with type 1 but not type 2 diabetes. *J Diabetes.*, v. 11, p. 665-673, 2019.
- Zaccardi, F.; Webb D.R.; Yates T.; Davies M.J. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*, v. 92, p.63-69, 2015.
- Zawrotniak, M.; Rapala-Kozik, M. Neutrophil extracellular traps (NETs): formation and implications. *Acta Abp Biochimica Polonica*. p. 277-284, 2013.