



CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

MARIA CAROLINE VIVAN SANTANA

AÇÃO MICROBICIDA DAS HISTONAS EM NETs

MARIA CAROLINE VIVAN SANTANA

AÇÃO MICROBICIDA DAS HISTONAS EM NETs

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sara Mataroli de Godoy

Apucarana
2024

MARIA CAROLINE VIVAN SANTANA

AÇÃO MICROBICIDA DAS HISTONAS EM NETs

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Sara Mataroli de Godoy
Orientadora Faculdade de Apucarana

Prof.^a Dra. Cássia Calixto de Campos
Faculdade de Apucarana

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana

Apucarana, 09 de novembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

O término deste Trabalho de Conclusão de Curso representa o fim de uma jornada acadêmica que foi repleta de desafios e conquistas. Neste momento de realização, gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que tornaram essa conquista possível.

Primeiramente, desejo expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Sara Mataroli de Godoy, pela orientação dedicada, paciência e sabedoria compartilhada ao longo deste processo. Seu comprometimento e conhecimento desempenharam um papel fundamental no sucesso deste trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha família pelo apoio, amor e compreensão durante todo esse período. A minha mãe por ser meu alicerce e ao meu pai por ser meu melhor amigo, queria que estivesse aqui.

A meus amigos Richard e Nathália, meus exemplos e apoio incondicional durante todo esse período. Seu encorajamento e confiança em mim foram motivações constantes.

Aos meus colegas de classe, pela colaboração e amizade, agradeço por compartilharmos juntos essa jornada acadêmica. Por fim, a todos os professores, amigos e entes queridos que se envolveram de diversas maneiras, minha gratidão sincera.

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e apoio de todos vocês. Muito obrigada.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

SANTANA, Maria Caroline Vivan. **Ação microbicida das histonas em NETs**. 43p Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo). Graduação em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana - Pr. 2024.

RESUMO

Os neutrófilos são células essenciais do sistema imune inato, sendo responsáveis por atuar na linha de defesa inicial contra infecções. Uma de suas funções contra patógenos é um tipo peculiar de morte celular programada conhecida como netose, onde eles liberam estruturas extracelulares chamadas “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NETs). As NETs são compostas por DNA, histonas e proteínas antimicrobianas, desempenhando um papel fundamental na captura e eliminação de patógenos. Existem três tipos de netose: netose suicida, netose vital e a netose mitocondrial. No contexto da netose suicida, os neutrófilos passam por um processo de descompactação da cromatina e rompimento da membrana nuclear, liberando fibras de cromatina decoradas com histonas e outras proteínas. Essas histonas, como H1, H2A, H2B, H3 e H4, são componentes críticos das NETs. As histonas em NETs podem provocar anormalidades morfológicas e rupturas de membrana, afetando a integridade celular de microrganismos patogênicos. Em associação a outros peptídeos antimicrobianos, as histonas exibem uma maior atividade inibitória contra alguns microorganismos, possuindo um papel crucial na indução de morte celular. Além disso, a capacidade em se ligar a lipopolissacarídeos através de interações eletrostáticas sugere um mecanismo de captura de células bacterianas com maior afinidade por bactérias Gram-negativas. Também, a histona pode perturbar a organização do DNA bacteriano e suprimir sua transcrição, interferindo na biogênese dos componentes celulares. Coletivamente, os estudos analisados evidenciam o potencial das histonas como agentes antimicrobianos, destacando suas interações complexas com componentes bacterianos e a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Armadilhas extracelulares de neutrófilos. Netose. Resistência antimicrobiana.

SANTANA, Maria Caroline Vivan. **Microbicidal action of histones in NETs.** 43p. Completion of course work (Paper). Bachelor's Degree in Biomedicine. College of Apucarana - Pr. 2024.

ABSTRACT

Neutrophils are essential cells of the innate immune system, acting as the initial line of defense against infections. One of their functions against pathogens is a peculiar type of programmed cell death known as netosis, where they release extracellular structures called “neutrophil extracellular traps” (NETs). NETs are composed of DNA, histones, and antimicrobial proteins, and play a fundamental role in the capture and elimination of pathogens. There are three types of netosis: suicidal netosis, vital netosis, and mitochondrial netosis. In the context of suicidal netosis, neutrophils undergo a process of chromatin decompaction and disruption of the nuclear membrane, releasing chromatin fibers decorated with histones and other proteins. These histones, such as H1, H2A, H2B, H3, and H4, are critical components of NETs. Histones in NETs can cause morphological abnormalities and membrane ruptures, affecting the cellular integrity of pathogenic microorganisms. In association with other antimicrobial peptides, histones exhibit greater inhibitory activity against some microorganisms, playing a crucial role in inducing cell death. Furthermore, the ability to bind to lipopolysaccharides through electrostatic interactions suggests a mechanism of bacterial cell capture and greater affinity for Gram-negative bacteria. In addition, histones can disrupt bacterial DNA organization and suppress its transcription, interfering with the biogenesis of cellular components. Collectively, the studies analyzed demonstrate the potential of histones as antimicrobial agents, highlighting their complex interactions with bacterial components and the possibility of developing new therapeutic strategies based on their antimicrobial activity.

Keywords: Neutrophil Extracellular Traps. NETosis. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Maturação dos neutrófilos	10
Figura 2 – Microscopia eletrônica de um neutrófilo regular	12
Figura 3 – NETs em microscópio eletrônico de varredura	15
Figura 4 – Tipos de NETose: (I) suicida; (II) vital e (III) mitocondrial	16
Figura 5 – Estrutura do nucleossomo	20

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
1.1 Origem e estrutura dos neutrófilos.....	9
1.2 Componentes dos Neutrófilos.....	10
1.3 Grânulos azurófilos	13
1.4 NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos.....	14
1.4.1 NETose: liberação das NETs.....	15
1.4.2 Componentes da NETs.....	18
1.5 Histonas	19
2 REFERÊNCIAS.....	21
3 ARTIGO.....	26
INTRODUÇÃO	28
METODOLOGIA	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Captura bacteriana por carga positiva e permeação de membrana	33
Histonas em sinergia com peptídeos antimicrobianos.....	37
Ação no DNA bacteriano.....	39
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40
4 ANEXO.....	43

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Origem e estrutura dos neutrófilos

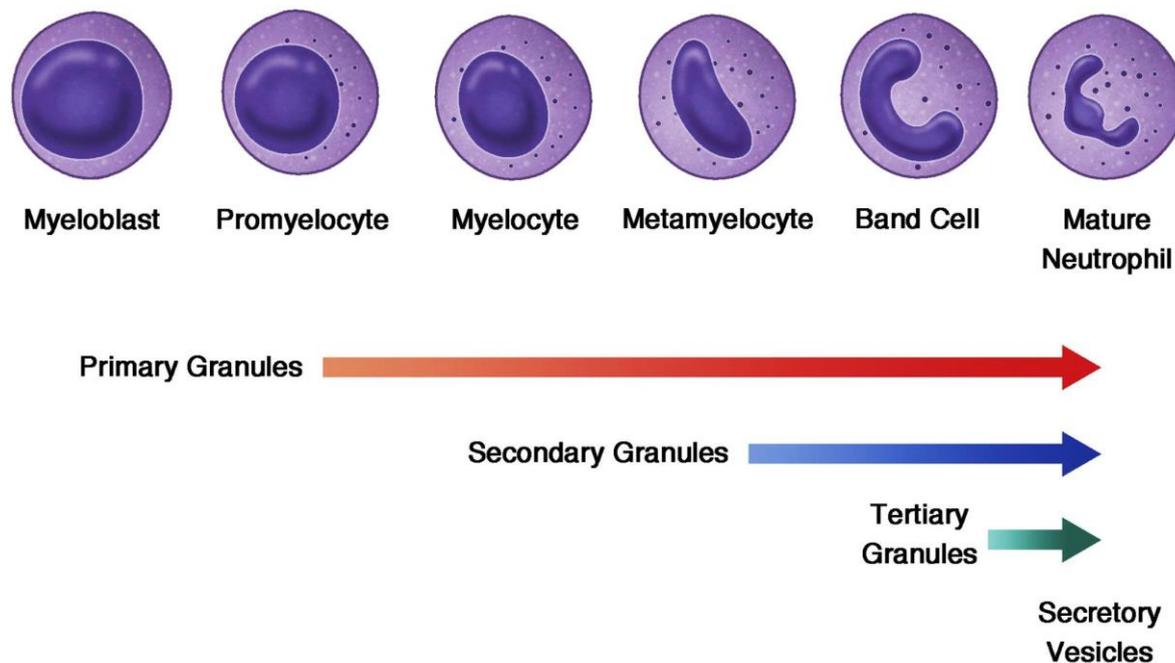
Os neutrófilos constituem a população de leucócitos circulantes mais abundante, circulam como células esféricas com várias projeções membranosas, núcleo polimórfico multilobulado e citoplasma com grânulos de composição heterogênea, contendo proteínas granulares características, como a mieloperoxidase (MPO), lactoferrina e gelatinase (como a Elastase Neutrófila - NE), que lhes permitem cumprir sua função antibacteriana. São produzidos na medula óssea, sendo que um humano adulto produz mais de 1×10^{11} neutrófilos por dia, com duração em média de 8 horas à 12 horas na circulação sanguínea, podendo chegar até 5 dias (Abbas; Lichtman; Pillai, 2023; Borregaard, 2010).

São células essenciais na imunidade, atuando fundamentalmente em processos de inflamação aguda e modulando a resposta a infecções por microrganismos comensais ou patogênicos, que em maioria, são reconhecidos e rapidamente atacados (Amulic, 2012; Burn, 2021). Dado que os neutrófilos também podem danificar os tecidos do hospedeiro, sua implantação é rigorosamente regulada e está interligada aos mecanismos de reconhecimento, enfrentamento e eliminação de patógenos por meio de três principais estratégias: fagocitose, degranulação e NETose – processo de liberação de armadilhas extracelulares por neutrófilos – (Zharkova et al., 2019).

Na medula óssea, a célula mielóide multipotente é a precursora dos granulócitos, com o mieloblasto sendo a célula mais imatura já comprometida a formar os três tipos de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos ou basófilos). Quando surgem granulações citoplasmáticas específicas nessa célula, ela passa a ser chamada de promielócito. Durante a maturação, a célula evolui para mielócito, metamielócito, granulócito com núcleo em bastonete e, finalmente, neutrófilo (Figura 1) (Junqueira; Carneiro, 2023a). O tempo total desde o aparecimento do mieloblasto até a maturação completa dos neutrófilos, tornando-os células circulantes no sangue, é de

aproximadamente 11 dias (Junqueira; Carneiro, 2023a).

Figura 1 – Maturação dos neutrófilos



Fonte: Lehman; Segal (2020).

1.2 Componentes dos Neutrófilos

Dentre os componentes celulares dos neutrófilo, o núcleo e os grânulos citoplasmáticos são os que mais chamam a atenção. O núcleo de um neutrófilo é multilobulado, geralmente com dois a cinco lóbulos conectados por filamentos de cromatina. Além de proporcionar proteção ao genoma, o núcleo regula a expressão gênica por meio da remodelação da cromatina, transcrição e processamento e exportação de RNA (Carvalho et al., 2015). É delimitado pelo envelope nuclear, que consiste em uma membrana bilipídica nuclear dupla, proteínas transmembrana associadas e lâmina nuclear, com funções de proteger e isolar a cromatina e o nucleoplasma do citoplasma, além de ser estrutura estabilizadora e relativamente rígida. Abrangendo a membrana dupla nuclear, o complexo ligante do núcleo e do citoesqueleto é formado por proteínas do envelope que medeiam o acoplamento

nuclear citoesquelético e a transmissão de forças biomecânicas do citoplasma para o nucleoplasma e vice-versa (Manley; Keightley; Lieschke, 2018).

Subjacente à membrana nuclear está a lâmina nuclear, uma estrutura semelhante a uma malha composta por filamentos intermediários de lâminas, proteínas que se prendem à interface nucleoplasmática da membrana nuclear interna por meio de proteínas integrais do envelope nuclear (Gerace; Blum; Blobel, 1978). A lâmina nuclear fornece suporte mecânico e influencia a forma, o tamanho, a flexibilidade e a replicação do núcleo. Além disso, ela interage com a cromatina, ancorando-a à borda nuclear nos domínios associados à lâmina. O nucleoplasma, que é o material onde a cromatina e outras estruturas estão presentes, preenche o núcleo (Davidson; Lammerding, 2014).

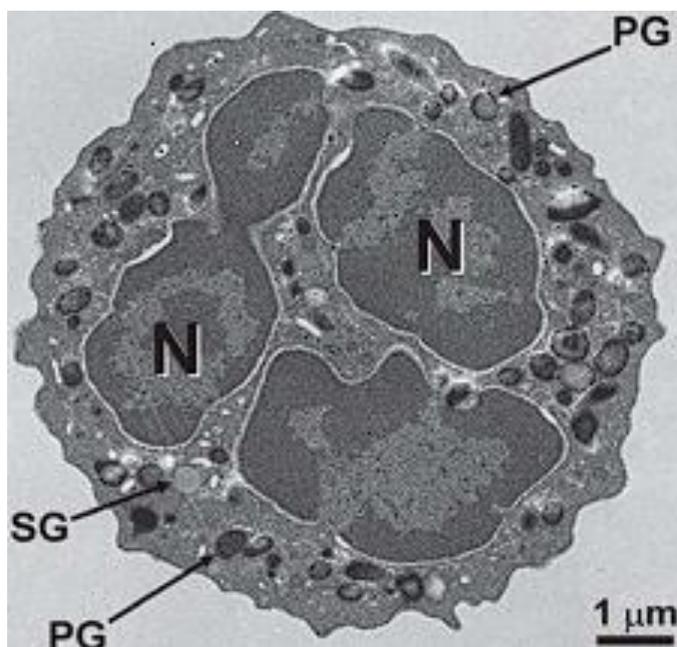
A cromatina é formada pelo DNA e proteínas associadas a ele, especialmente as proteínas histonas, cujas funções vão além do empacotamento do material genético, sendo responsáveis pela primeira linha de controle da expressão gênica. As proteínas histonas condensam a cromatina, reduzindo o comprimento das moléculas de DNA, por meio da formação dos nucleossomos, as unidades fundamentais da cromatina (Junqueira; Carneiro, 2023b).

Já o citoplasma dos neutrófilos contém vários subconjuntos de grânulos que desempenham um papel crucial no armazenamento de proteínas antimicrobianas, proteases, e outros componentes essenciais para a resposta oxidativa. Esses grânulos também abrigam uma diversidade de receptores de membrana com afinidade por moléculas de adesão endotelial, proteínas da matriz extracelular, produtos bacterianos e mediadores inflamatórios solúveis. A movimentação dos grânulos é o que permite ao neutrófilo exercer sua função efetora na imunidade (Faurichou; Borregaard, 2003). As proteínas dos grânulos são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e processadas no aparelho de Golgi, onde recebem o acabamento final e são direcionadas para seus destinos. A formação dos grânulos (granulopoiese) começa no estágio de maturação, durante a transição de mieloblasto para promielócito, momento em que vesículas imaturas se fundem no aparelho de Golgi, originando os primeiros grânulos (Bainton; Farquhar, 1966).

Os grânulos primários por seu alto teor de mieloperoxidase (MPO) foram denominados de “grânulos positivos para peroxidase” (Figura 2), mais adiante, devido a sua afinidade pelo corante básico Azul A, foram denominados de grânulos azurófilos

(Bainton; Ulliyot; Farquhar, 1971).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de um neutrófilo regular



N: núcleo; PG: grânulos primários (corados positivamente para mieloperoxidase); SG: grânulos secundários. Fonte: Jan et al. (2006).

Os grânulos negativos para peroxidase, com base no tempo de aparecimento e conteúdo de proteínas da matriz granular, podem ser subdivididos em grânulos específicos (secundários – Figura 2) e de gelatinase (terciários). Grânulos específicos são formados nos mielócitos e metamielócitos e possuem alto teor de lactoferrina e um baixo teor de gelatinase, enquanto grânulos de gelatinase se formam em células em bastonetes e neutrófilos segmentados, tendo baixo teor de lactoferrina, mas alto teor de gelatinase (Kjeldsen et al., 1993).

Assim como os grânulos primários (azurófilos), os grânulos secundários (específicos) e terciários contêm vários peptídeos que interagem e combatem microrganismos (Faurichou; Borregaard, 2003). Grande parte da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica e da lactoferrina está presente nos grânulos secundários, juntamente com a pentraxina 3, haptoglobina, proteína antimicrobiana catiônica humana-18 e olfactomedina-4. Nos grânulos terciários, a concentração de gelatinase é de aproximadamente 43%, conforme análise espectrométrica de massa, e eles compartilham 18% das proteínas com os grânulos azurófilos, além de conterem

heparan- α -glucosaminidase N-acetyltransferase, Ig-R FcR, IgE e polipeptídeo I de alta afinidade, entre outros (Rørvig et al., 2013).

1.3 Grânulos azurófilos

Os grânulos azurófilos apresentam grande heterogeneidade em tamanho, forma e várias subpopulações com características físicas, citoquímicas e morfológicas. A proteína definidora dos grânulos positivos para peroxidase, a mieloperoxidase (MPO), é uma hemoproteína microbicida que tem peso molecular de 150 kDa e é liberada nos fagossomos ou no espaço extracelular após ativação dos neutrófilos. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido pela NADPH oxidase (complexo enzimático que atua na transferência de elétrons para o oxigênio molecular através de membranas), aumentando seu potencial tóxico. A oxidação de cloreto, tirosina e nitrito pelo sistema H_2O_2 – MPO resulta na formação de ácido hipocloroso (HClO) e outros produtos de cloração, como radicais de tirosina e intermediários reativos de nitrogênio. Por serem altamente reativos, esses produtos possuem capacidade de interagir com as membranas de microrganismos, contribuindo para a atividade microbicida dos neutrófilos (Klebanoff, 1999).

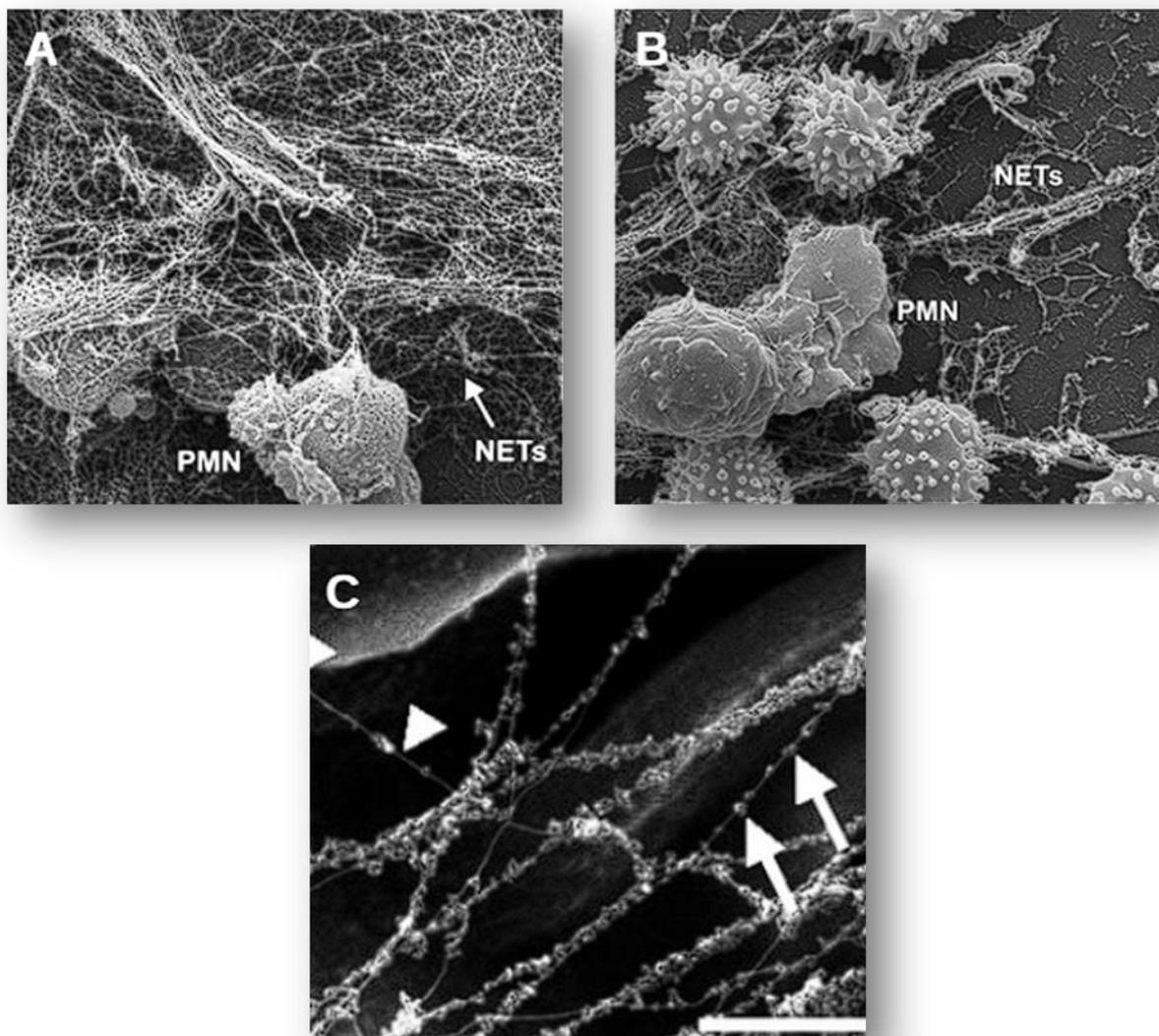
Além da MPO, outro constituinte principal dos grânulos azurófilos são as alfa-defensinas. Correspondendo a 5% do todo o conteúdo proteico dos neutrófilos, as alfa-defensinas são pequenos peptídeos catiônicos (~3,5 kDa), antimicrobianos e citotóxicos. Assim como a MPO, as alfas-defensinas dos neutrófilos humanos apresentam atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias, fungos, vírus envelopados e protozoários (Ganz et al., 1985), e exercem seu efeito antimicrobiano através da formação de poros transmembranares multiméricos (Wimley; Selsted; White, 1994). Outras proteínas granulares azurófilas são as serina proteases, proteinase 3, catepsina G, elastase de neutrófilos, proteína indutora de permeabilidade bacteriana (BPI) e a protease enzimática inativa CAP37 (também conhecida como azurocidina) (Faurischou; Borregaard, 2003).

1.4 NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) – do inglês “Neutrophil Extracellular Traps” – fazem parte do repertório de mecanismos antimicrobianos desses granulócitos. A composição global das NETs não está completamente estabelecida, mas sabe-se serem estruturas compostas de grânulos e componentes do núcleo que, como teias, capturam e matam bactérias extracelularmente. Brinkmann et al. (2004) detalham as NETs como fibras muito frágeis que, em microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV), apresentam trechos com um diâmetro de 15 nm a 17 nm e domínios globulares de cerca de 25 nm que se agrupam em fios maiores com diâmetros de até 50 nm (Figura 3).

As amostras obtidas por Obemayer et al. (2014) mostraram NETs semelhantes, *in vitro*, sendo o principal componente fios de DNA, entrelaçados irregularmente e formando agregados que se emaranham com bactérias. Os locais onde os fios grossos se desintegram para formar uma malha mais fina são frequentemente associados a pequenas saliências globulares, que também podem se agrupar para formar agregados maiores. Essas saliências correspondem em forma e tamanho (cerca de 25 nm) aos “domínios globulares” (Figura 3) dos NETs descritos por Brinkmann et al. (2004).

Figura 3 – NETs em microscópio eletrônico de varredura



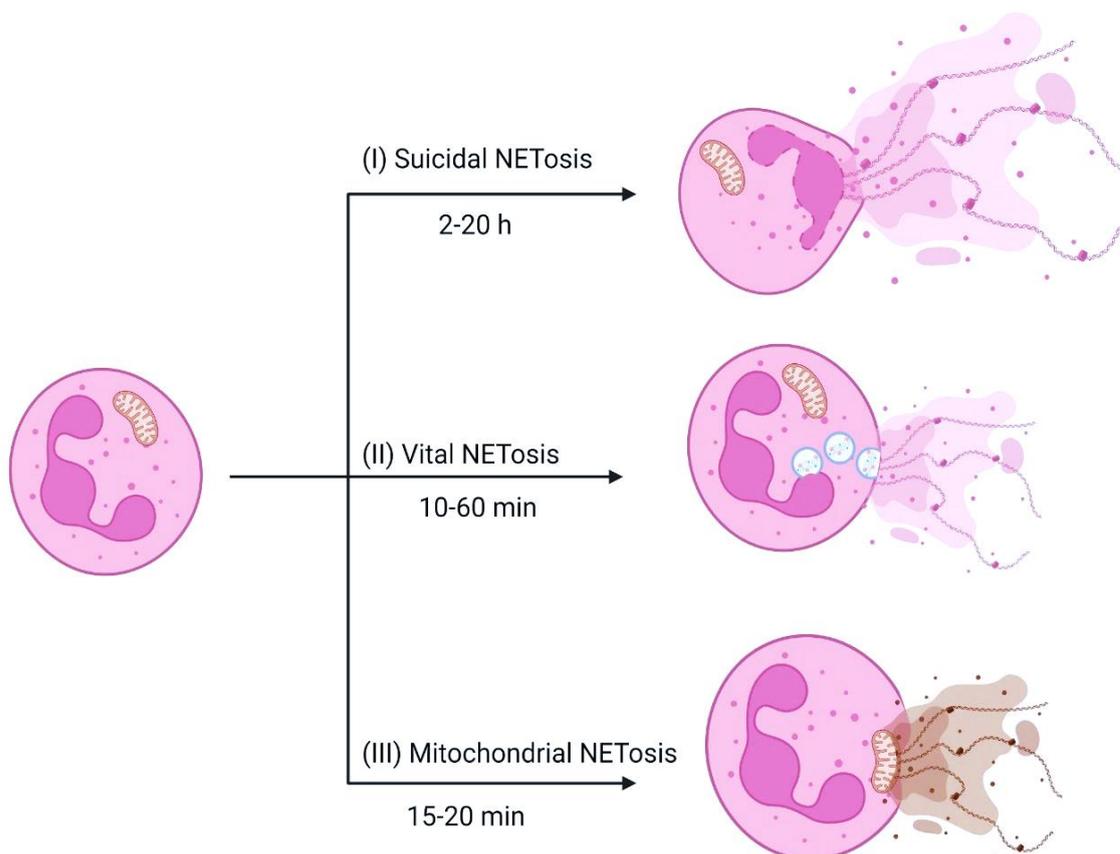
(A; B) NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos ativados com Phorbol 12-myristate 13-acetate.
 PMN: Células polimorfonucleares (neutrófilos). Fonte: Adaptado de Della Coletta et al. (2015).
 (C) Fibras lisas de NETs (15 a 17 nm, pontas de seta) e domínios globulares (25nm, seta).
 Fonte: Adaptado de Brinkmann et al. (2004).

1.4.1 NETose: liberação das NETs

O processo pelo qual os neutrófilos liberam as NETs é chamado NETose. Originalmente a NETose era considerada um tipo de morte celular dos neutrófilos

alternativa a necrose e a apoptose (Borregaard, 2010). Entretanto, Yipp; Kubes (2013) discutiram em seu trabalho a existência da NETose suicida, a NETose vital e NETose mitocondrial (Figura 4), nas quais os neutrófilos podem matar ou inibir, extracelularmente, microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas.

Figura 4 – Tipos de NETose: (I) suicida; (II) vital e (III) mitocondrial



Fonte: Liang et al. (2024).

A NETose suicida ocorre por um processo gradual que envolve a descondensação da cromatina, o inchaço do núcleo e a liberação do nucleoplasma para o citoplasma, o que resulta na perfuração da membrana celular e na formação de NETs, culminando na morte do neutrófilo. Em contraste, a NETose vital permite a liberação das NETs sem a morte celular, possibilitando que as funções normais da célula continuem. Também na NETose mitocondrial, a liberação de DNA mitocondrial pelos neutrófilos ocorre de forma independente da morte celular (Figura 4) (Tan; Aziz;

Wang, 2021; Yipp; Kubes, 2013; Yousefi et al., 2009).

Bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos estão entre os organismos capazes de induzir a liberação de NETs (Díaz-Godínez; Carrero, 2019). Além disso, moléculas de lipopolissacarídeo (LPS), ionóforos (moléculas que se ligam a íons metálicos), Phorbol-12-miristato-13-acetato (éster de forbol com diversas interações celulares), diversas citocinas inflamatórias (IL-1 γ , TNF- γ , IL-8, IFN- γ), cristais (urato monossódico, alúmen) e complexos imunes (solúveis e imobilizados) também podem induzir a formação de NETs (Bornhöfft et al., 2019; Ortmann; Kolaczowska, 2017; Song et al., 2019).

Fuchs et al. (2007) relataram que no processo de NETose induzido por Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), os núcleos dos neutrófilos começam a perder seus lóbulos, e a cromatina a se descondensar, enquanto a membrana nuclear permanece intacta. Após 180 min o envelope nuclear se desintegra em numerosas pequenas vesículas e a cromatina se descondensa, entrando em contato direto com os componentes citoplasmáticos e granulares, causando o desaparecimento dos grânulos e a mistura dos componentes celulares. Toda a elastase de neutrófilos (NE) se associa à cromatina, que de forma íntegra, é liberada para o espaço extracelular, característica essencial das NETs (Fuchs et al., 2007).

Outros mecanismos de ativação da NETose envolvem a translocação da NE para o núcleo em decorrência da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela enzima NADPH oxidase (NOX2) ou pela ativação da peptidil arginina deiminase 4 (PAD4, enzima que catalisa a desaminação e citrulinização de resíduos de arginina em proteínas) em resposta ao aumento do influxo de cálcio extracelular (Díaz-godínez et al., 2018). A PAD4 ativada induz a formação de histona H3 citrulinada no núcleo, que por sua vez promove a despolimerização da cromatina e sua liberação por exocitose para formar NETs (Zhang et al., 2022; Von Köckritz-Blickwede; Winstel, 2022).

A formação das NETs pode depender tanto de ROS fagossômicos (dependentes de NADPH) quanto de ROS mitocondriais, ou pode ocorrer sem a participação de nenhuma delas. Diferentes estudos relataram a independência de ROS na formação de NETs, destacando que fatores como o ambiente experimental, a natureza dos indutores de NETs, os agentes patogênicos e a resposta imune influenciam esse processo (Ortmann; Kolaczowska, 2017).

Independente dos estímulos, na maioria dos casos, a ativação de enzimas granulares como NE e MPO ou membros da família PAD (peptidylarginine deiminase), principalmente PAD4, são indispensáveis (Neubert et al., 2019). Também é importante enfatizar que diferentes estímulos podem conferir composições diferenciais de NET. No entanto, ainda não está completamente claro como essas variações na composição se refletem em funções protetoras ou patológicas distintas das NETs (Shafqat *et al.*, 2022).

1.4.2 Componentes da NETs

As estruturas fibrosas das NETs, liberadas durante a NETose, contêm uma variedade de proteínas antimicrobianas, incluindo aquelas associadas ao DNA, bem como proteínas granulares e citoplasmáticas. Essas redes são capazes de capturar diferentes tipos de microrganismos, eliminando-os por meio da exposição a concentrações locais elevadas de peptídeos antimicrobianos (Urban et al., 2009). No entanto, é importante destacar que as vias de ativação e as variações da NETose ainda são temas em debate.

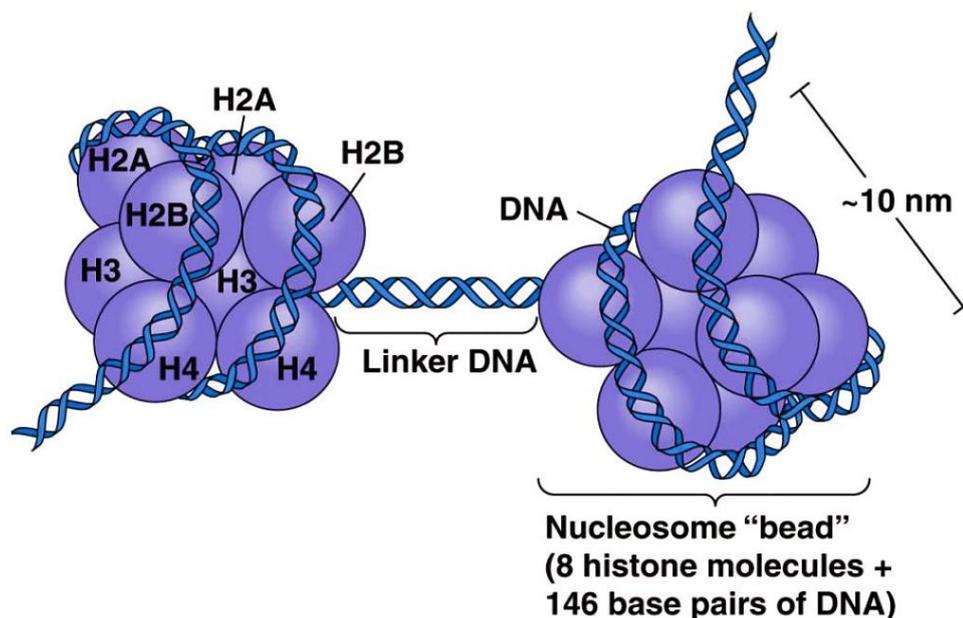
Ainda que a composição das NETs varie de acordo o estímulo de sua liberação, de maneira geral, tais estruturas contêm, além de moléculas de DNA e histonas, que representam cerca de 70% das proteínas associadas, uma diversidade de proteínas de neutrófilos e proteínas bactericidas/aumentadoras de permeabilidade (BPI). Estudos de proteômica e imunofluorescência identificaram cerca de 30 proteínas diferentes compondo as NETs, incluindo proteínas de grânulos azurófilos, como NE, catepsina G e MPO, proteínas de grânulos secundários e terciários, como lactoferrina e gelatinase, além de defensinas, catelicidina (LL-37), calprotectina, proteinase 3 e proteínas citosólicas como as S100. A alta concentração dessas proteínas antimicrobianas é responsável pela captura e eliminação de patógenos, reforçando a função microbicida das NETs (Brinkmann et al., 2004; Li et al., 2022; Negreros; Flores-Suárez, 2021; Ngo et al., 2022; Ortmann; Kolaczowska, 2017; Urban et al., 2009; Zharkova et al., 2019).

1.5 Histonas

As histonas são pequenas proteínas nucleares que formam os nucleossomos e interagem com os ácidos nucleicos devido à sua alta carga positiva, conferida pelos resíduos de lisina e arginina. Elas atuam como reguladoras da transcrição do DNA, funcionando como um "interruptor" que controla o acesso ao material genético (Szatmary et al., 2018; Moiana; Aranda; De Larrañaga, 2021). No entanto, as histonas também são encontradas no citoplasma, nas membranas celulares e no fluido extracelular, onde atuam na defesa do hospedeiro e promovem respostas inflamatórias (Li et al., 2022). Tais proteínas catiônicas podem formar estruturas anfipáticas α -helicoidais e, portanto, compartilham características essenciais dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPS), sendo um importante componente antimicrobiano das NETs (Agak et al., 2021).

Duas moléculas de cada um dos quatro tipos de histonas — H2A, H2B, H3 e H4 — se unem para formar um cerne octamérico. O DNA se enrola em torno desse cerne, dando cerca de 1,7 volta, o que resulta na formação do nucleossomo (Figura 5). Esse padrão se repete ao longo da cadeia de DNA em intervalos regulares, constituindo o primeiro nível de compactação do material genético, o nucleossomo. Com a participação da histona H1, os nucleossomos se dobram em um padrão de zig-zag, formando as fibras de cromatina com 30 nm de espessura, levando o DNA a um nível maior de compactação (Junqueira; Carneiro, 2023b).

Figura 5 – Estrutura do nucleossomo



Fonte: Caputi; Candeletti; Romualdi (2017).

Cada histona possui uma cauda N-terminal caracterizada pela presença de resíduos de lisina e arginina, que se projetam para fora da estrutura central. Estas regiões amino-terminais são altamente flexíveis e passam por diversas modificações pós-traducionais, como acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação, as quais desempenham um papel crucial na replicação do DNA e na regulação da expressão gênica (Grunstein, 1997). Os padrões de metilação, fosforilação e acetilação das histonas atuam como marcadores do estado transcrricional de genes em várias doenças, estando associados a condições inflamatórias (Helin; Dhanak, 2013).

Em 1958, James Hirsch relatou pela primeira vez os efeitos bactericidas das histonas, embora o mecanismo de ação ainda não estivesse claro. Hirsch propôs que a capacidade bactericida das histonas se devia à interação positiva dessas proteínas com componentes aniônicos da parede celular bacteriana, causando danos à barreira osmótica. Posteriormente, sugeriu-se que as histonas extracelulares, especialmente H3 e H4, seriam citotóxicas para o endotélio, indicando que tais proteínas desempenhariam múltiplas funções, tanto no núcleo quanto no ambiente extracelular (Xu et al., 2009).

2 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023.

AGAK, G. W. et al. Extracellular traps released by antimicrobial T H 17 cells contribute to host defense. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, e141594, 2021.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.

BAINTON, D. F.; FARQUHAR, M. G. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 28, p. 277–301, 1966.

BAINTON, D. F.; ULLYOT, J. L.; FARQUHAR, M. G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 134, p. 907–934, 1971.

BORNHÖFFT, K. F.; GALUSKA, S. P. Glycans as modulators for the formation and functional properties of neutrophil extracellular traps: Used by the forces of good and evil. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 449931, 2019.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, p. 657-670, 2010.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BURN, G. L. et al. The neutrophil. **Immunity**, v. 54, p. 1377-1391, 2021.

CAPUTI, F. F.; CANDELETTI, S.; ROMUALDI, P. Epigenetic approaches in neuroblastoma disease pathogenesis. In: **Neuroblastoma-Current State and Recent Updates**. London: IntechOpen, 2017.

CARVALHO, L. O. et al. The neutrophil nucleus and its role in neutrophilic function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, p. 1831-1836, 2015.

DAVIDSON, P. M.; LAMMERDING, J. Broken nuclei–lamins, nuclear mechanics, and disease. **Trends in cell biology**, v. 24, p. 247-256, 2014.

DELLA COLETTA, A. M. et al. Neutrophil extracellular traps identification in tegumentary lesions of patients with paracoccidioidomycosis and different patterns of

NETs generation in vitro. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, p. e0004037, 2015.

DÍAZ-GODÍNEZ, C. et al. Entamoeba histolytica Trophozoites Induce a Rapid Non-classical NETosis Mechanism Independent of NOX2-Derived Reactive Oxygen Species and PAD4 Activity. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, 374898, 2018.

DÍAZ-GODÍNEZ, C.; CARRERO, J. C. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. **Bioscience Report**, v. 39, BSR20180916, 2019.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection**, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v. 176, p. 231-241, 2007.

GANZ, T. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, p. 1427-1435, 1985.

GERACE, L.; BLUM, A.; BLOBEL, G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. **The Journal of cell biology**, v. 79, p. 546-566, 1978.

GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, v. 389, p. 349-352, 1997.

HELIN, K.; DHANAK, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. **Nature**, v. 502, p. 480-488, 2013.

HIRSCH, J. G. Bactericidal action of histone. **The Journal of experimental medicine**, v. 108, p. 925-944, 1958.

JAN, M-S. et al. CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and α -defensin release. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 41, p. 6-16, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023a.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023b.

KJELDSEN, L. et al. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation, **Blood**, v. 82, p. 3183-3191, 1993.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

LEHMAN, H. K.; SEGAL, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, p. 1535-1544, 2020.

LIANG, Y. et al. Targeting NETosis: nature's alarm system in cancer progression. **Cancer Drug Resistance**, v. 7, 28, 2024.

LI, X. et al. Histones: The critical players in innate immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1030610, 2022.

MANLEY, H. R.; KEIGHTLEY, M. C.; LIESCHKE, G. J. The neutrophil nucleus: an important influence on neutrophil migration and function. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2867, 2018.

MOIANA, M.; ARANDA, F.; DE LARRAÑAGA, G. A focus on the roles of histones in health and diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 94, p. 12–19, 2021.

NEGREROS, M.; FLORES-SUÁREZ, L. F. A proposed role of neutrophil extracellular traps and their interplay with fibroblasts in ANCA-associated vasculitis lung fibrosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, 102781, 2021.

NEUBERT, E. et al. Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce in vitro Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2428, 2019.

NGO, A. T. P.; GOLLOMP, K. Building a better NET: Neutrophil extracellular trap targeted therapeutics in the treatment of infectious and inflammatory disorders. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, e12808, 2022.

OBERMAYER, A. et al. New aspects on the structure of neutrophil extracellular traps from chronic obstructive pulmonary disease and in vitro generation. **PloS one**, v. 9, e97784, 2014.

ORTMANN, W.; KOLACZKOWSKA, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell and tissue research**, v. 371, p. 473–488, 2018.

RØRVIG, S. et al. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, p. 711-721, 2013.

SHAFQAT, A. et al. Emerging role of neutrophil extracellular traps in the complications of diabetes mellitus. **Frontiers in medicine**, v. 9, 995993, 2022.

SONG, Y. et al. Antimicrobial Microwebs of DNA–Histone Inspired from Neutrophil Extracellular Traps. **Advanced Materials**, v. 31, p1807436, 2019.

SZATMARY, P. et al. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, p. 4617-4629, 2018.

TAN, C.; AZIZ, M.; WANG, P. The vitals of NETs. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 110, p. 797–808, 2021.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 5, e1000639, 2009.

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; WINSTEL, V. Molecular Prerequisites for Neutrophil Extracellular Trap Formation and Evasion Mechanisms of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 836278, 2022.

WIMLEY, W. C.; SELSTED, M. E.; WHITE, S. H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. **Protein Science**, v. 3, p. 1362-1373, 1994.

XU, J. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nature medicine**, v. 15, p. 1318-1321, 2009.

YIPP, B. G.; KUBES, P. NETosis: how vital is it? **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, p. 2784-2794, 2013.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, p. 1438-1444, 2009.

ZHANG, Y. et al. Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Gastrointestinal Tumors: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 334, 2022.

ZHARKOVA, O. et al. A flow cytometry-based assay for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps in mixed cell populations. **Cytometry Part A**, v. 95, p. 268-278, 2019.

3 ARTIGO**Ação microbicida das histonas em NETs****Microbicidal action of histones in NETs****Maria Caroline Vivan Santana**

Discente do curso de Bacharelado em Biomedicina
Faculdade de Apucarana – FAP R. Osvaldo de Oliveira, 600 – Jardim Flamingos,
Apucarana – PR, CEP 86811-500, Brasil
E-mail: santvivancaroline@gmail.com

Sara Mataroli de Godoy

Pós-doutorado em Genética e Biologia Molecular
Faculdade de Apucarana – FAP R. Osvaldo de Oliveira, 600 – Jardim Flamingos,
Apucarana – PR, CEP 86811-500, Brasil
E-mail: godoy.sm@hotmail.com

RESUMO

Este artigo revisou estudos recentes sobre a atividade antimicrobiana de histonas e suas interações em armadilhas extracelulares (NETs). As histonas podem provocar anormalidades morfológicas e rupturas de membrana, afetando a integridade celular de microrganismos patogênicos. Em associação a outros peptídeos antimicrobianos, as histonas exibem uma maior atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e possuem um papel crucial na indução de morte celular bacteriana. Junto com outros peptídeos antimicrobianos, como a mieloperoxidase, as histonas operam sinergicamente para matar a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, a capacidade em se ligar a lipopolissacarídeos através de interações eletrostáticas sugere um mecanismo de captura de células bacterianas e mais afinidade a bactérias Gram-negativas. Estudos adicionais com biomateriais miméticos de NETs se mostraram de grande importância para entender o funcionamento dessas. Coletivamente, os estudos analisados evidenciam o potencial das histonas como agentes antimicrobianos, destacando suas interações complexas com componentes bacterianos e a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Armadilhas extracelulares de neutrófilos. Netose. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

This paper reviewed recent studies on the antimicrobial activity of histones and their interactions in extracellular traps (NETs). Histones can cause morphological abnormalities and disrupt cellular integrity in pathogenic microorganisms. In association with other antimicrobial peptides, histones exhibit greater inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, playing a crucial role in inducing bacterial cell death. Furthermore, their ability to bind to lipopolysaccharides through electrostatic interactions suggests a mechanism for capturing bacterial cells and a greater affinity for Gram-negative bacteria. Additional studies with NET-mimetic biomaterials have proven to be very important for understanding their function. Collectively, the analyzed studies demonstrate the potential of histones as antimicrobial agents, highlighting their complex interactions with bacterial components and the possibility of developing new therapeutic strategies based on their antimicrobial activity.

Keywords: Neutrophil Extracellular Traps. NETosis. Antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

A descoberta de novos antibióticos tem estagnado nos últimos anos, enquanto a resistência bacteriana continua a crescer de forma alarmante, resultando em infecções cada vez mais difíceis de tratar e potencialmente letais. Diante dessa crise, é urgente o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas alternativas. Uma abordagem promissora envolve a exploração dos mecanismos naturais de defesa do organismo, os quais podem ser a base para novas terapias que superem a resistência bacteriana, oferecendo alternativas mais eficazes no combate às infecções (Doolin et al., 2020; Duong; Gross; Siryaporn, 2020).

Os neutrófilos são células que atuam como a "primeira linha" de defesa contra patógenos no local da inflamação. Eles desempenham papéis fundamentais na eliminação de microrganismos e parasitas, na regulação do sistema imunológico e no desenvolvimento de doenças (Zharkova et al., 2019). Como os neutrófilos também podem causar danos aos tecidos do hospedeiro, sua ação é rigorosamente regulada por três principais mecanismos: fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs – Neutrophil Extracellular Traps) (Zharkova et al., 2019).

NETs são grandes estruturas extracelulares semelhantes a teias, compostas por proteínas granulares montadas em arranjos de cromatina (DNA) descondensada, as quais prendem, neutralizam e matam bactérias, fungos, vírus e parasitas, prevenindo sua disseminação (Negreros; Flores-Suárez, 2021). A NETose (liberação das NETs), inicialmente vista como morte celular dos neutrófilos, pode ser de três tipos: suicida, vital e mitocondrial. Na suicida, ocorre a morte celular e liberação de NETs; na vital, as NETs são liberadas sem que haja a morte do neutrófilo; e na mitocondrial, apenas o DNA mitocondrial é liberado (Borregaard, 2010; Yipp; Kubes, 2013; Yousefi et al., 2009).

A NETose suicida ocorre por um processo gradual que envolve a descompactação da cromatina, o inchaço do núcleo e a liberação do nucleoplasma para o citoplasma, o que resulta na perfuração da membrana celular e na formação de NETs, culminando na morte do neutrófilo. Em contraste, a NETose vital permite a liberação das NETs sem a morte celular, possibilitando que as funções normais da

célula continuem. Também na NETose mitocondrial, a liberação de DNA mitocondrial pelos neutrófilos ocorre de forma independente da morte celular (Tan; Aziz; Wang, 2021; Yipp; Kubes, 2013; Yousefi et al., 2009).

A composição exata das NETs é variável, e sua diversidade parece depender dos diferentes estímulos que desencadeiam sua liberação (Negreros; Flores-Suárez et al., 2021; Burgener et al., 2020). Estudos detalhados de NETs por microscopia eletrônica de varredura e confocal, bem como análises proteômicas, mostraram que estas são compostas de finas fibras de cromatina decoradas com cerca de 30 proteínas de neutrófilos, enzimas de origem granular e histonas nucleares – H2A, H2B, H3, H4 e H1 – (Ortmann; Kolaczowska, 2017).

Dentre os componentes-chave das NETs, as histonas, pequenas proteínas nucleares inicialmente descritas como empacotadoras de DNA, se destacam. Nos nucleossomos, tais proteínas interagem com ácidos nucleicos devido à sua carga positiva, controlando a transcrição gênica e a compactação do DNA (Moiana et al., 2021; Szatmary et al., 2018). No entanto, as histonas também estão presentes no citoplasma, membranas celulares e fluido extracelular, atuando na defesa do hospedeiro e promovendo respostas inflamatórias (Li et al., 2022). Sendo hidrofóbicas e catiônicas, formam estruturas α -helicoidais anfipáticas, compartilhando características dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPS), o que as torna importantes componentes antimicrobianos das NETs (Agak et al., 2021).

As histonas tiveram sua ação microbicida observada pela primeira vez em 1942, ganhando mais atenção após a descoberta das NETs (Duong et al., 2020). As histonas H2A, H3 e H4, por exemplo, apresentaram atividade anti-estafilocócica por mecanismos como danos à membrana, formação de poros ou perturbação celular sem alterações morfológicas evidentes (Pietrocola et al., 2019). A interação das histonas com lipopolissacarídeos (LPS) também sugere ação antimicrobiana pela ligação à membrana bacteriana (Li et al., 2022). Apesar dos avanços, os mecanismos de ação das histonas contra microrganismos dentro das NETs ainda são pouco compreendidos e escassamente abordados na literatura científica. Como a compreensão desses processos naturais pode oferecer novas abordagens terapêuticas no combate às bactérias resistentes e à crise global de resistência antimicrobiana, esta revisão busca elucidar como as histonas exercem suas propriedades microbicidas na NETose suicida.

METODOLOGIA

Definição do método e estratégias de busca

Esse trabalho é uma revisão sistemática da literatura, onde o Framework/acrônimo “3WH” foi utilizado, aplicando-se os seguintes termos: Who/quem: Histonas; What/ o que: Ação microbicide; When/onde: Em nets; How/como: Revisão sistemática da literatura.

As seguintes palavras-chaves e Operadores Booleanos foram utilizados como estratégias de busca: (["Antimicrobial"] OR ["Anti-Infective Agents"]) AND ("Histones") AND (["extracellular traps"] OR ["Neutrophil extracellular traps"] OR ["Netosis"]) AND "Anti-Infeciosos" AND "Histonas" AND "Armadilhas Extracelulares". As buscas foram realizadas nas seguintes bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), PubMed, e Portal de Periódicos da CAPES.

Para organizar e filtrar os temas abordados em cada artigo retornado nas buscas, foi elaborado um Fluxograma PRISMA 2020 (Page et al., 2021). Esse fluxograma proporciona uma representação visual de todo o processo de busca e seleção de artigos nas bases de dados, detalhando a quantidade de artigos obtidos com a aplicação das estratégias de busca em cada base até o final, destacando quantos foram efetivamente utilizados (Rethlefsen et al., 2021).

Critérios de elegibilidade e exclusão

Durante a revisão, foram considerados elegíveis os artigos científicos provenientes de: 1) pesquisa originais; 2) publicados nos idiomas português e inglês; 3) disponíveis em texto integral; 4) que tenham sido publicados nos últimos cinco anos. Como critério de exclusão, não foram selecionados artigos de revisão e textos não revisados por pares (literatura cinzenta) como teses, dissertações, monografias.

Os artigos recuperados de todas as bases de dados selecionadas foram importados para o software de gerenciamento de referências Mendeley Desktop

(Elsevier, 2024), onde as duplicatas foram identificadas e eliminadas. Em seguida, realizou-se uma triagem individual com a leitura dos títulos e resumos, excluindo os artigos que não atendiam aos critérios de elegibilidade. Para os resumos selecionados, os artigos completos foram revisados de forma detalhada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final das buscas nas bases de dados, foram identificados 263 artigos: 78 na PubMed, 73 na BVS e 112 na CAPES. Após a remoção das duplicatas e registros cujo texto não se encontrava disponível na íntegra, 126 artigos permaneceram. Aplicando os critérios de elegibilidade e exclusão, foram excluídos 32 artigos com base no título, 44 pelo resumo, 8 por não aderirem ao tema e 45 por se tratarem de revisões. No total, 8 artigos foram selecionados para a análise deste estudo (Figura 1).

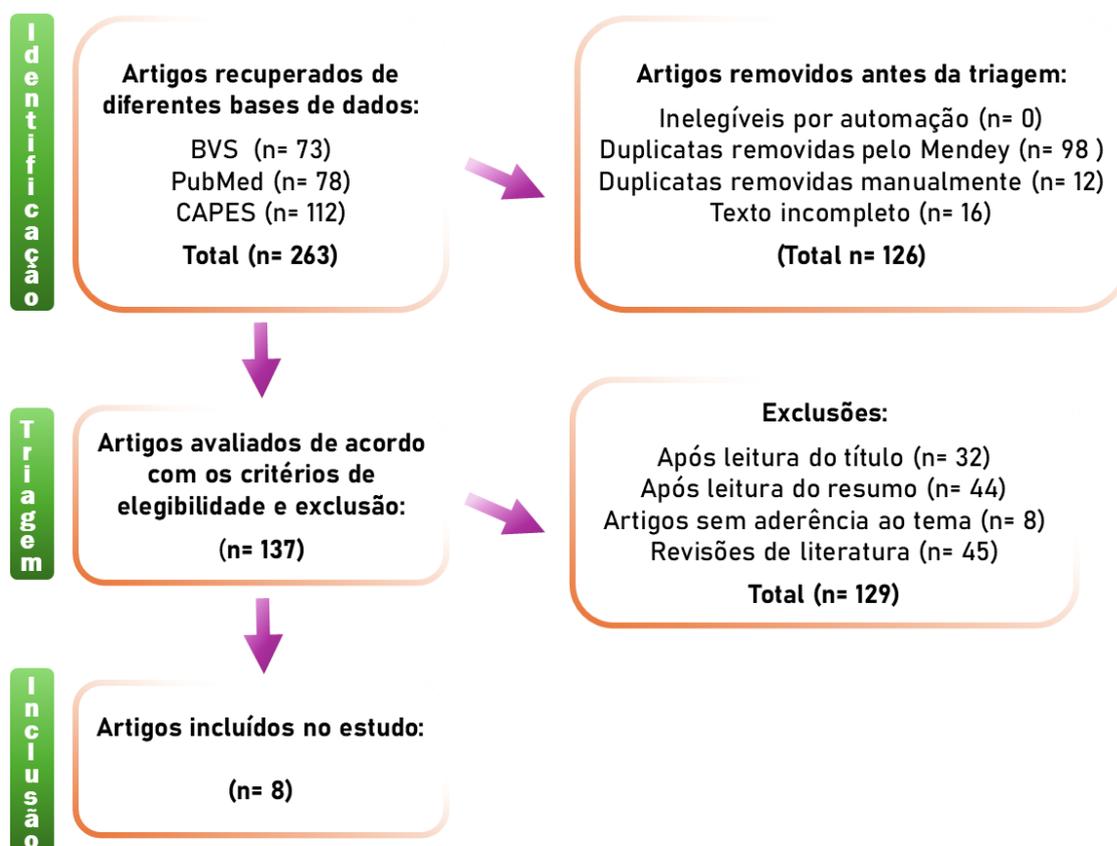


Figura 1. Fluxograma PRISMA do processo de busca e seleção de artigos nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), PubMed, e Portal de Periódicos da CAPES. O processo foi realizado com o auxílio do software de gerenciamento de referências Mendely (Elsevier, 2024).

A análise dos artigos revelou avanços no papel das histonas e NETs na defesa antimicrobiana. Estudos destacaram a interferência das histonas no gradiente de prótons bacterianos e na organização cromossômica, além de sua interação com proteínas da parede celular de *Candida albicans*, identificando novos mecanismos patógeno-hospedeiro. Inspirados pelas NETs, foram desenvolvidas microredes antimicrobianas e NETs sintéticas, permitindo análises sobre suas funções, especialmente contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, a proteína FnBPB de *S. aureus* foi identificada como protetora contra a ação das histonas. Detalhes dos artigos recuperados por meio das estratégias de buscas aqui aplicadas podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1. Artigos recuperados das plataformas Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), PubMed e Portal de Periódicos da CAPES e utilizados no presente estudo.

Autor/ano	Título do artigo	Descrição geral do estudo
Doolin et al. (2020)	Mammalian histones facilitate antimicrobial synergy by disrupting the bacterial proton gradient and chromosome organization	Investiga como as histonas de mamíferos podem facilitar a sinergia antimicrobiana interferindo no gradiente de prótons bacterianos e na organização dos cromossomos.
Karkowska-Kuleta et al. (2019)	Proteinous components of Neutrophil Extracellular Traps are arrested by the cell wall proteins of <i>Candida albicans</i> during fungal infection, and can be used in the host invasion.	Investiga a interação entre NETs e proteínas da parede celular de <i>Candida albicans</i> durante a infecção, destacando um mecanismo de patógeno-hospedeiro até então desconhecido.
Pietrocola et al. (2019)	Fibronectin-binding protein B (FnBPB) from <i>Staphylococcus aureus</i> protects against the antimicrobial activity of histones	Destaca o papel da proteína B de ligação à fibronectina (FnBPB) de <i>Staphylococcus aureus</i> na proteção das bactérias contra a atividade antimicrobiana das histonas.
Song et al. (2019)	Antimicrobial microwebs of DNA–histone inspired from Neutrophil Extracellular Traps	Desenvolve microredes antimicrobianas, inspiradas em NETs, fornecendo uma nova abordagem para combater infecções bacterianas.
Tanaka et al. (2022)	Dual roles of extracellular histone H3 in host defense: its differential regions responsible for antimicrobial and cyto- toxic properties and their modes of action	Explora os diferentes papéis da histona H3 extracelular na defesa do hospedeiro, destacando suas propriedades antimicrobianas e citotóxicas.
Yang et al. (2023)	Synthetic Neutrophil Extracellular Traps dissect bactericidal contribution of NETs under regulation of α -1- antitrypsin	Desenvolveram NETs sintéticas, que permitiram uma análise detalhada das contribuições de cada componente.
Yang et al. (2021)	Dosage-dependent antimicrobial activity of DNA-histone microwebs against <i>Staphylococcus aureus</i>	Investiga a atividade antimicrobiana dependente da dosagem de microredes de DNA-histona contra <i>Staphylococcus aureus</i> .

Zlatina; Galuska (2019)	Polysialic acid modulates only the antimicrobial properties of distinct histones	Explora como o ácido polissialílico (polySia) modula seletivamente as propriedades antimicrobianas de histonas específicas.
-------------------------	--	---

Captura bacteriana por carga positiva e permeação de membrana

Em análises da atividade antimicrobiana usando SEM (*Scanning Electron Microscopy/ Microscópio eletrônico de varredura*), Tanaka et al. (2022) revelaram que a histona H3 atua na membrana plasmática de microrganismos patogênicos, incluindo fungos, e causa anormalidades morfológicas e ruptura da integridade celular. Em seus ensaios antimicrobianos, os autores fragmentaram a histona H3 em 4 partes (H3DP1-4), evidenciando que o peptídeo derivado H3DP2 mostra maiores atividades inibitórias de crescimento contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Além disso, H3DP2 induziu anormalidades morfológicas, com concentrações significativas efetivas mínimas, conforme observado com histona H3 de comprimento total. Ainda, seus ensaios de ligação a endotoxina revelaram que o peptídeo H3DP2, bem como H3DP1 e H3DP4, é capaz de interagir tanto ao lipopolissacarídeo (LPS) quanto ao ácido lipoteicoico (LTA), moléculas de superfície bacteriana Gram-negativas e positivas, respectivamente, sugerindo que a histona H3 pode capturar células bacterianas ligando-se a essas moléculas. Em contrapartida, o único peptídeo aniônico, H3DP3, não apresentou atividade inibidora do crescimento contra os microrganismos nem atividade de ligação à endotoxina, enfatizando que o potencial antimicrobiano das histonas deriva da sua carga positiva (Tanaka et al., 2022).

Microteias (*Microwebs*) sintéticas, com diferentes frações de peso de histonas (25%, 40%, 50% e 57%), foram desenvolvidas por Song et al. (2019) para melhor compreender o funcionamento das NETs. Em seus ensaios, os autores demonstraram uma maior densidade de células do patógeno urinário Gram-negativo *E. coli* capturadas pelas *Microwebs* com carga positiva (potencial zeta positivo) em comparação com as microteias sintéticas neutras e com carga negativa. Menos de 10% das células de *E. coli* se ligaram às *Microwebs* sintéticas carregadas negativamente (-9 mV) e quase neutras (-1 a +1 mV). Também, à medida que o tempo de incubação aumentava, algumas células de *E. coli* inicialmente ligadas a estas

Microwebs sintéticas, separaram-se. O potencial de membrana dessas bactérias destacadas foi elevado ($\zeta \approx 0$ mV) em comparação com a *E. coli* não tratada ($\zeta \approx -12$ mV). Isso provavelmente foi causado pela adaptação das bactérias às Microwebs sintéticas ou pela adsorção das histonas na parede celular bacteriana. Ainda, algumas das células de *E. coli* aprisionadas em Microwebs sintéticas encolheram de forma semelhante às aquelas presas em NETs, sugerindo, a permeação bem-sucedida do iodeto de propídio nessas células, a perda da integridade da membrana (Song et al., 2019).

Através de plaqueamento e contagem de colônias, Song et al. (2019) confirmaram que as Microwebs sintéticas carregadas positivamente inibiram eficientemente a dispersão de *E. coli* em comparação com as Microwebs carregadas negativamente. O aprisionamento bacteriano dependente de carga pode ser explicado por uma barreira de energia estabelecida pela interação eletrostática entre a parede celular bacteriana (por exemplo, lipopolissacarídeo) e Microwebs sintéticas. Nesse caso, há uma maior fração de histona catiônica ($w_{his} > 40\%$) e, portanto, uma maior força eletrostática aumentando a eficiência da captura bacteriana.

Auxiliariamente, o cultivo separado em DNA isolado e soluções de histonas, demonstrou que a manutenção da viabilidade das células de *E. coli* cultivadas na solução de DNA isolado. Em contraste, um aumento na taxa de morte celular foi observado após células de *E. coli* serem cultivadas em uma série de soluções de histonas. A observação por microscopia eletrônica de varredura (SEM) dessas células mortas mostrou cápsulas danificadas com poros nanométricos.

Apesar de experimentos de degradação mediada por DNases demonstrarem que a rede de nanofibras de DNA também contribui para a inibição da proliferação bacteriana, a histona, e não o DNA, se mostrou o componente bactericida direto contra *E. coli*. (Song et al., 2019). Entretanto, sabemos que essa ação isolada das histonas não pode ser aplicada em NETs *in vivo*, visto que se deve considerar diversos outros componentes presentes nas NETs e no ambiente (Zlatina; Galuska, 2019; Yang et al., 2023).

Um experimento adicional demonstrou que a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é menos suscetível à morte mediada por histonas em comparação com a Gram-negativa *Escherichia coli*, destacando diferenças na ação das histonas e NETs entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Yang et al.,

2021). Essas observações indicam variações significativas nas respostas bacterianas às NETs, dependendo das cepas bacterianas, além da constituição das próprias NETs. Isso sugere que a permeabilidade das histonas policatiônicas através da parede celular bacteriana é um fator crítico para sua atividade antimicrobiana.

Procurando uma melhor forma de reproduzir a atividade antimicrobiana das NETs, Yang et al. (2023) apresentou uma síntese de biomateriais miméticos de NETs, com uma formulação bioquímica que representa uma gama mais ampla de constituintes de tal estrutura. Importantes enzimas antimicrobianas, como a elastase de neutrófilos (NE) e a mieloperoxidase (MPO) foram incorporadas em complexos DNA-histona (DHCs) para avaliar suas contribuições para a morte de bactérias em estruturas semelhantes a NET. Esta abordagem ascendente de síntese de materiais biomiméticos fornece um modelo para relacionar a atividade antimicrobiana das NETs com sua estrutura e composição. Além disso, os autores investigaram a enzima alfa-1-antitripsina (AAT) derivada de tecidos, na regulação da atividade antimicrobiana dos NETs em um contexto epitelial pulmonar, para compreender a interação entre os NETs e o ambiente tecidual (Yang et al., 2023).

O estudo selecionou diferentes proteínas antimicrobianas encontradas em NETs contra uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) e obteve um modelo biomaterial minimalista. As concentrações fisiológicas de proteínas NET, incluindo histona, azurocidina, NE, MPO, catepsina G (CG) e lactoferrina (LTF) foram estimadas usando suas razões estequiométricas para DNA em NETs a partir da análise por espectrometria de massa de NETs produzidos por neutrófilos. Os resultados apresentaram que a histona (na concentração de 500 a 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$) interrompeu a parede celular bacteriana e distorceu PAO1 em formas filamentosas. Na cultura bacteriana tratada com as histonas, mais de 90% das PAO1 foram mortas, sugerindo uma forte capacidade bactericida (Figura 2). Em contraste, outros componentes da NET, incluindo DNA, NE e MPO, apresentaram-se menos potentes contra PAO1. Observações por microscopia eletrônica de varredura revelam que os complexos DNA-NE, DNA-MPO e DNA-CG obtidos são nanopartículas amorfas. Essas nanopartículas aderem às paredes celulares das bactérias, mas nenhum dano distinto na parede celular pôde ser identificado. No geral, as histonas e a CG foram vistas como os antimicrobianos mais potentes entre as proteínas testadas em concentrações fisiológicas dentro das NETs deste estudo (Yang et al., 2023).

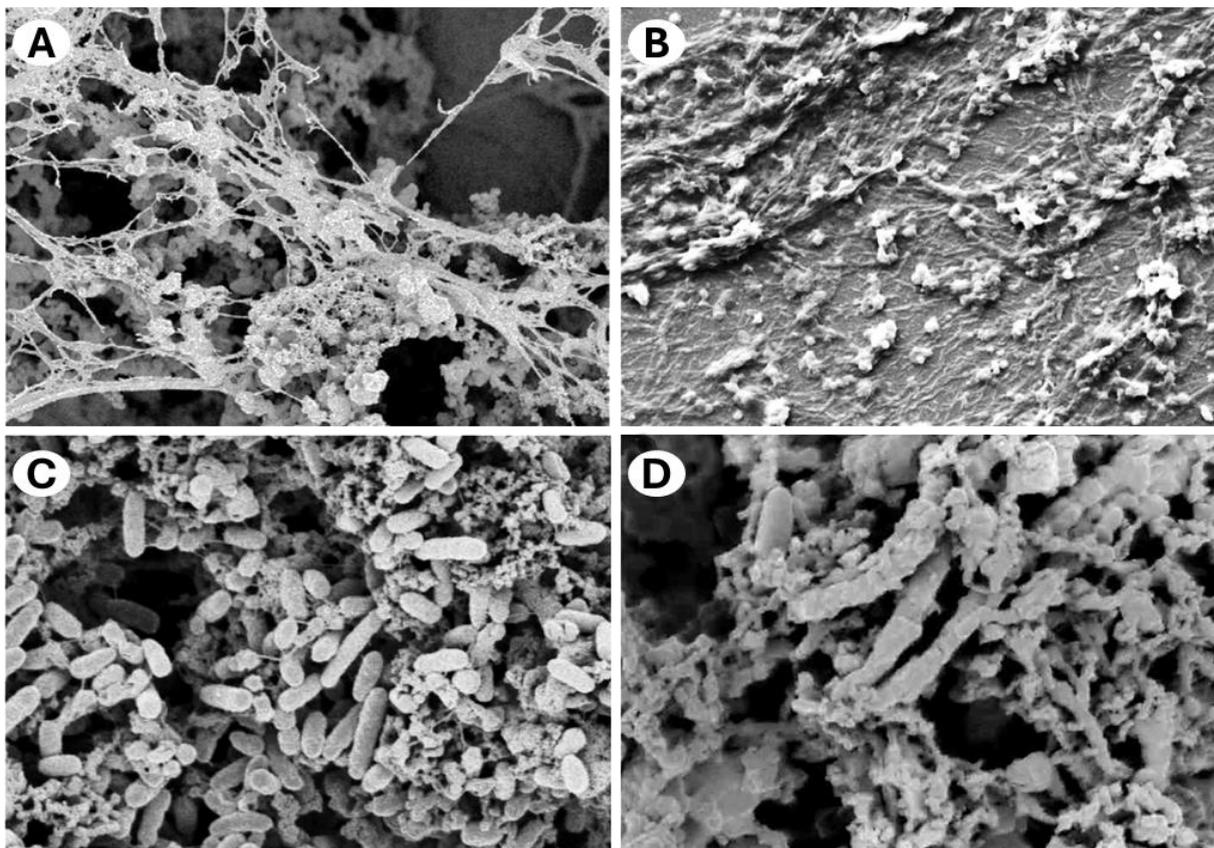


Figura 2. Micrografias capturadas por microscopia eletrônica de varredura mostrando a atividade antimicrobiana dos complexos sintéticos de DNA-proteína contra *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). (A) Imagens do complexo DNA-histona (DHC). (B) Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos – NETs. (C) PAO1 aprisionado em DHC após cultura por 1 hora. (D) Bactérias lisadas pelo DHC após exposição por 2 horas. Fonte: Adaptado de Yang et al. (2023). Artigo original distribuído sob uma Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

Yang et al. (2023) avaliaram, ainda, se diferentes combinações de proteínas nas malhas de DNA-proteína operam sinergicamente ou antagonicamente para matar *P. aeruginosa*. Mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE), duas principais proteínas NET, com diferentes mecanismos antimicrobianos, foram misturadas separadamente com DHCs para criar estruturas semelhantes a NET mais complexas. Tanto a NE quanto a MPO puderam se unir com eDNA (material genético presentes no ambiente de forma livre) através de interações eletrostáticas, resultando em diminuição de sua atividade enzimática (Yang *et al.*, 2023).

A eficácia microbicida das histonas está relacionada à sua carga, o que foi demonstrado em um experimento com leveduras de *C. albicans* que ao produzirem DNases conseguem se libertar das NETs (Karkowska-Kuleta et al., 2021). No estudo, observou-se que as histonas e outras proteínas das NETs permanecem ligadas às

membranas das células fúngicas, podendo beneficiá-las contra os tecidos epiteliais do hospedeiro através da interação dos AMPs com as membranas celulares, resultando em um aumento significativo na intensidade de danos celulares locais.

No estudo de Pietrocola et al. (2019), a proteína de ligação à fibronectina B (FnBPB) de *S. aureus*, que auxilia na adesão a tecidos e formação de biofilmes, mostrou-se eficaz em permitir a evasão das NETs. Foi identificada como a principal proteína de superfície que se liga às histonas, especialmente à histona H3, protegendo a bactéria ao bloquear suas ações antimicrobianas. Através do mecanismo “dock, lock, and latch” (DLL) e interações eletrostáticas, FnBPB reduz a ação bactericida das histonas, o que é reforçado pelo fato de cepas mutantes de *S. aureus*, incapazes de produzir FnBPB, terem apresentado menor sobrevivência em NETs. Além disso, a adição de anticorpos anti-histonas restaurou a sobrevivência dessas cepas, indicando a importância das histonas como principais agentes bactericidas em NETs (Pietrocola et al., 2019).

Histonas em sinergia com peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) eliminam diretamente as bactérias ao formar poros transitórios em suas membranas, resultando no aumento da permeabilidade desta (Doolin et al., 2020). Doolin et al. (2020) atribuiu às histonas H2A a função de aumento de poros de membrana mediado por LL-37 (AMP de catelicidina humana). Postulou-se que a H2A poderia impactar significativamente os gradientes de íons através da membrana, interrompendo a produção de ATP. Assim, mediram a força próton-motriz bacteriana de *E. coli* (PMF) usando o sensor óptico de prótons de proteorodopsina (PROPS), que aumenta a fluorescência com perda de PMF devido à despolarização elétrica. A rápida dinâmica capturou picos elétricos nas membranas bacterianas devido a alterações no PMF, onde o tratamento de *E. coli* com H2A não teve efeito no PMF, consistente com a falta de permeabilização da membrana por H2A. Já as células tratadas com H2A e LL-37 ou com H2A e o antibiótico polimixina B (PMB) exibiram fluorescência de PROPS significativamente maior do que as células tratadas apenas com LL-37 ou PMB, indicando que H2A

despolariza ainda mais a membrana e rompe o PMF (Doolin et al., 2020).

Os AMPs co-localizam com histonas em NETs e essa co-localização indica que eles podem atuar em conjunto no combate a microrganismos. Tanto as histonas quanto os AMPs são catiônicos, contêm alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos e possuem a capacidade de formar hélices alfa. No entanto, as histonas têm a capacidade de condensar o DNA de mamíferos, uma característica que o AMP LL-37 não possui. Isso sugere que, além da função conjunta, as histonas podem ter outras funções antimicrobianas distintas daquelas relacionadas aos AMPs (Doolin et al., 2020).

Os experimentos realizados com *E. coli*, por Doolin et al. (2020), em condições fisiológicas demonstram que uma vez dentro da célula, o H2A reorganiza o DNA cromossômico bacteriano e inibe sua transcrição, levando as bactérias à morte. Os autores constataram, ainda, que esses mecanismos auto amplificadores são de natureza geral, estendendo-se a outras histonas, incluindo H3, e outros AMPs, como a magainina-2. Neste experimento, também foi observado que os efeitos sinérgicos de H2A/LL-37 foram marcantes no nível subcelular, conforme medido por microscopia eletrônica de varredura. Em *E. coli* tratada com LL-37 ou H2A, poucas diferenças morfológicas celulares foram observadas. No entanto, o tratamento combinado LL-37/H2A causou danos celulares dramáticos, incluindo agregação celular e produção extensiva de componentes insolúveis na superfície externa da membrana e nas superfícies circundantes (Doolin et al., 2020).

Embora a formação de poros induzida por AMPs tenha um impacto bactericida significativo, as bactérias podem se recuperar dessa ação ao reparar os poros da membrana, especialmente quando induzidos apenas pelo LL-37. A presença da histona H2A intensifica os efeitos permeabilizantes dos AMPs, facilitando a captação de H2A e LL-37 e impedindo a reparação dos poros. Os poros estabilizados pela H2A permitem o efluxo de citoplasma e outros componentes celulares, resultando na ruptura da membrana. Esse efeito sinérgico entre H2A e AMPs inibe o mecanismo de reparo bacteriano, levando à morte irreversível da célula (Doolin et al., 2020).

Ação no DNA bacteriano

A histona H2A perturba a organização do DNA bacteriano e suprime sua transcrição. Embora as histonas se liguem ao DNA eucariótico, a sua capacidade de interagir com o DNA bacteriano não está bem estabelecida. No trabalho de Doolin et al. (2020) os autores levantaram a hipótese de que o H2A se complexa com o DNA microbiano, perturbando seus mecanismos de replicação e a transcrição. No estudo mencionado foram medidos os potenciais de interação do DNA de *E. coli* e H2A, através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. O aumento dos níveis de H2A inibiu a migração de DNA, indicando interações entre H2A e o DNA bacteriano. Também foram mensurados os efeitos da H2A no cromossomo de *E. coli* vivas, utilizando apenas H2A. Nesse procedimento não houve alteração na migração, o que era esperado, uma vez que a H2A sozinha não entra no citoplasma. Ao adicionar LL-37 às células, o cromossomo bacteriano passou a exibir um padrão alado, sugerindo que a entrada de H2A induziu a reorganização cromossômica (Doolin et al., 2020).

Também foram realizados RNA-seq (análise de sequência de RNA) a partir de concentrações elevadas e crescentes de histonas, como 50 e 100 µg/mL (H2A), tal qual pode ocorrer localmente em NETs. Como resultado, foi constatado que a H2A induz a regulação positiva seletiva de genes dos componentes da biogênese da membrana, como o *wza*. O gene *wza* induz a expressão de genes pertencentes ao cluster de ácido colônico, que por sua vez, auxiliam na manutenção do potencial de membrana, ao mesmo tempo que diminui globalmente a transcrição de DNA (Doolin et al., 2020).

CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que o principal mecanismo microbicida das histonas em NETs deriva de sua carga catiônica, permitindo a ligação às membranas celulares dos microrganismos e resultando em captura, deformação, ruptura e desequilíbrio celular.

Também mostrou que combinação de histonas com AMPs aumenta a eficácia antimicrobiana, afetando também o DNA bacteriano e inibindo a transcrição global. Contudo, as abordagens utilizadas pelos estudos realizados não consideraram a complexidade do ambiente fisiológico, como a degradação por enzimas e fagócitos. Além disso, métodos analíticos tradicionais se mostraram insuficientes para elucidar completamente a atividade das NETs. Apesar dos desafios, o papel central das histonas nas NETs destaca seu potencial para futuras terapias antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

Agak, G. W.; Mouton, A.; Teles, R. M.; Weston, T.; Morselli, M.; Andrade, P. R.; Pellegrini, M.; Modlin, R. L. Extracellular traps released by antimicrobial T H 17 cells contribute to host defense. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, e141594, 2021.

Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, p. 657-670, 2010.

Burgener, S. S.; Schroder, K. Neutrophil extracellular traps in host defense. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, p. 1–15, 2020.

Doolin, T.; Amir, H. M.; Duong, L.; Rosenzweig, R.; Urban, L. A.; Bosch, M.; Pol, A.; Gross, S. P.; Siryaporn, A. Mammalian histones facilitate antimicrobial synergy by disrupting the bacterial proton gradient and chromosome organization. **Nature communications**, v. 11, p. 3816–3888, 2020.

Duong, L.; Gross, S. P.; Siryaporn, A. A novel antibacterial strategy: Histone and antimicrobial peptide synergy. **Microbial Cell**, v. 7, p. 309-311, 2020.

Elsevier. Mendeley Reference Manager v2.122.0. 2024. Disponível em: <https://www.mendeley.com>. Consulta em: 22 outubro 2024.

Karkowska-Kuleta, J.; Smolarz, M.; Satala, D.; Zawrotniak, M.; Wronowska, E.; Bochenska, O.; Kozik, A.; Nobbs, A. H.; Gogol, M. Proteinous components of neutrophil extracellular traps are arrested by the cell wall proteins of *Candida albicans* during fungal infection, and can be used in the host invasion. **Cells**, v. 10, 2736, 2021.

Li, X.; Ye, Y.; Peng, K.; Zeng, Z.; Chen, L.; Zeng, Y. Histones: The critical players in innate immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1030610, 2022.

Moiana, M.; Aranda, F.; De Larrañaga, G. A focus on the roles of histones in health and diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 94, p. 12–19, 2021.

Negreros, M.; Flores-Suárez, L. F. A proposed role of neutrophil extracellular traps and their interplay with fibroblasts in ANCA-associated vasculitis lung fibrosis.

Autoimmunity Reviews, v. 20, 102781, 2021.

Ortmann, W.; Kolaczowska, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell and tissue research**, v. 371, p. 473–488, 2018

Page, M. J.; Moher, D.; Bossuyt, P. M.; Boutron, I.; Hoffmann, T. C.; Mulrow, C. D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J. M.; Akl, E. A.; Brennan, S. E.; Chou, R.; Glanville, J.; Grimshaw, J. M.; Hróbjartsson, A.; Lalu, M. M.; Li, T.; Loder, E. W.; Mayo-Wilson, E.; McDonald, S.; McGuinness, L. A.; Stewart, L. A.; Thomas, J.; Tricco, A. C.; Welch, V. A.; Whiting, P.; McKenzie, J. E. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. **BMJ**, v. 372, 2021.

Pietrocola, G.; Nobile, G.; Alfeo, M. J.; Foster, T. J.; Geoghegan, J. A.; De Filippis, V.; Speziale, P. Fibronectin-binding protein B (FnBPB) from *Staphylococcus aureus* protects against the antimicrobial activity of histones. **Journal of biological chemistry**, v. 294, p. 3588-3602, 2019.

Rethlefsen, M. L.; Kirtley, S.; Waffenschmidt, S.; Ayala, A. P.; Moher, D.; Page, M. J.; Koffel, J. B.; PRISMA-S Group. PRISMA-S: an extension to the PRISMA statement for reporting literature searches in systematic reviews. **Systematic reviews**, v. 10, p. 1-19, 2021.

Song, Y.; Kadiyala, U.; Weerappuli, P.; Valdez, J. J.; Yalavarthi, S.; Louttit, C.; Knight, J. S.; Moon, J. J.; Weiss, D. S.; VanEpps, J. S.; Takayama, S. Antimicrobial Microwebs of DNA–Histone Inspired from Neutrophil Extracellular Traps. **Advanced Materials**, v. 31, 1807436, 2019.

Szatmary, P.; Huang, W.; Criddle, D.; Tepikin, A.; Sutton, R. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, p. 4617–4629, 2018.

Tan, C.; Aziz, M.; Wang, P. The vitals of NETs. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 110, p. 797–808, 2021.

Tanaka, Y.; Yamanaka, N.; Koyano, I.; Hasunuma, I.; Kobayashi, T.; Kikuyama S.; Iwamuro, S. Dual roles of extracellular histone H3 in host defense: Its differential regions responsible for antimicrobial and cytotoxic properties and their modes of action. **Antibiotics**, v. 11, p. 1240, 2022.

Yang, T.; Yang, S.; Ahmed, T.; Nguyen, K.; Yu, J.; Cao, X.; Zan, R.; Zhang, X.; Shen, H.; Fay, M. E.; Williams, E. K.; Lam, W. A.; VanEpps, J. S.; Takayama, S.; Song, Y. Dosage-dependent antimicrobial activity of DNA-Histone Microwebs against *Staphylococcus Aureus*. **Advanced materials interfaces**, v. 8, 2100717, 2021.

Yang, T.; Yu, J.; Ahmed, T.; Nguyen, K.; Nie, F.; Zan, R.; Li, Z.; Han, P.; Shen, H.; Zhang, X.; Takayama, S.; Song, Y. Synthetic neutrophil extracellular traps dissect

bactericidal contribution of NETs under regulation of α -1-antitrypsin. **Science Advances**, v. 9, eadf2445, 2023.

Yipp, B. G.; Kubes, P. NETosis: how vital is it? **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, p. 2784-2794, 2013.

Yousefi, S.; Mihalache, C.; Kozlowski, E.; Schmid, I.; Simon, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, p. 1438-1444, 2009.

Zharkova, O.; Tay, S. H.; Lee, H. Y.; Shubhita, T.; Ong, W. Y.; Lateef, A.; MacAry, P. A.; Kim Lim, L. H.; Connolly, J. E.; Fairhurst, M. A flow cytometry-based assay for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps in mixed cell populations. **Cytometry Part A**, v. 95, p. 268-278, 2019.

Zlatina, K.; Galuska, S. P. Polysialic Acid Modulates Only the Antimicrobial Properties of Distinct Histones. **ACS Omega**, v. 4, p. 1601–1610, 2019.

4 ANEXO

Normas da Revista Brazilian Journal of Development

Author Guidelines

The BJD accepts only original articles, not published in other journals. Articles presented at events are accepted, provided that this information is made available by the authors.

The rules for formatting and preparing originals are:

- A maximum of 20 pages, with a maximum of 8 authors;
- Font Times New Roman, size 12, line spacing of 1.5;
- Figures, Charts and Tables must appear together with the text, editable, in font 10, both for the content and for the title (which must appear just above the graphic element) and font (which must appear just below the graphic element).
- Title in Portuguese, English and Spanish, at the beginning of the file, with font 14;
- Abstract along with keywords, with single spacing, just below the title;
- The file sent must not contain the identification of the authors.

This journal adopts as an editorial policy the guidelines for good practices in scientific publication of the National Association for Research and Postgraduate Studies in Administration (ANPAD), available at: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Publication model: BJD template