



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Aryella Maryah Couto Correa

**Estudo dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos
durante a lesão aguda pulmonar induzida por malária**

Rio de Janeiro

2024

Aryella Maryah Couto Correa

**Estudo dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos durante a
lesão aguda pulmonar induzida por malária**

Dissertação apresentada, como requisito
para obtenção de título de Mestre, ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientadora: Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques

Coorientadora: Dra. Tatiana Almeida Pádua

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C824 Correa, Aryella Maryah Couto

Estudo dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos durante a lesão aguda pulmonar induzida por malária / Aryella Maryah Couto Correa. - 2024.

142 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques
Coorientadora: Dra. Tatiana Almeida Pádua

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Lesão pulmonar aguda – Fisiopatologia – Teses. 2. Malária – Complicações – Teses. 3. Inflamação – Imunologia – Teses. 4. Receptor CB2 de canabinoide – Agonistas. I. Henriques, Maria das Graças Muller de Oliveira. II. Pádua, Tatiana Almeida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.936

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Aryella Maryah Couto Correa

Estudo dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos durante a lesão aguda pulmonar induzida por malária

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em 27 de março de 2024.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Dra. Tatiana Almeida Pádua
Fundação Oswaldo Cruz

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Luzia da Silva Sampaio
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Tatiana Maron Gutierrez
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida e pela sabedoria concedida. E aos meus pais, Eloisa e Pedro (*in memoriam*), por me oferecerem a melhor educação, por sonharem comigo os meus sonhos, por todo o amor, dedicação, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida! Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda sabedoria, forças, sustento e presença ao longo de toda a minha trajetória. Esse trabalho só é real graças a Ti.

À minha orientadora, Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques pelo seu tempo, paciência, orientação, atenção, dedicação, incentivo, confiança e cuidado dedicados a mim ao longo desta etapa de formação. Por acreditar que eu seria capaz de fazer um excelente trabalho mesmo quando eu mesma não acreditava. Por ser um exemplo e inspiração. Agradeço a credibilidade e a oportunidade que me foram concedidas para meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal. Através da sua orientação pude reconhecer que sempre podemos ir além. Muito obrigada por tanto e por tudo!

À minha coorientadora, Dra. Tatiana Almeida Pádua por toda confiança depositada em mim em relação ao mestrado. Por todas as reuniões, intermináveis conversas e discussões de resultados em que sempre me auxiliou a organizar os conhecimentos adquiridos. Por cada "calma, Ary, você sabe exatamente o que está fazendo", por sofrer junto comigo a ansiedade de um resultado, seja ele referente a prêmios ou bolsas e até mesmo os resultados experimentais. Por fazer eu me sentir literalmente ouvida durante a etapa do mestrado. Por sempre vibrar com cada pequena conquista que tenho, seja ela acadêmica, profissional ou pessoal. Por toda sua dedicação, incentivo e apoio. Por ser um exemplo e inspiração. Obrigada por ter proporcionado o meu pertencimento ao estudo da malária. Muito obrigada por tanto e por tudo!

À Dra. Elaine Cruz Rosas, chefe do Laboratório de Farmacologia Aplicada que não participou diretamente da minha orientação durante o mestrado, porém agradeço pela amizade, atenção, ensinamentos, puxões de orelha e pela oportunidade de convívio e por me possibilitar desenvolver este trabalho no Laboratório de Farmacologia Aplicada;

À Dra. Mariana Conceição de Souza, por ter sido a grande responsável pelo meu primeiro contato com o estudo da malária e receptores canabinoides! Por ter me olhado devagar e com cuidado. Por fazer eu me sentir literalmente abraçada. Por acreditar que eu era capaz de fazer um excelente trabalho mesmo quando eu mesma não acreditava. Por todo apoio, incentivo, confiança e parceria. Por sempre vibrar com cada pequena conquista que tenho, seja ela acadêmica, profissional ou pessoal. Por todas as conversas e conselhos durante esses cinco anos que sempre me inspiram e claro, por sempre tentar me acalmar com sua tranquilidade e paciência. Por toda sua dedicação. Por ser um exemplo e inspiração. Muito obrigada por tanto e por tudo!

À Dra. Carmen Penido pela oportunidade que me proporcionou de poder atuar como monitora de sua disciplina para Pós-graduação, assim como por sua disponibilidade em conversar e aconselhar. Obrigada pela sua amizade, confiança, incentivo e apoio;

Ao Dr. Thadeu Costa por toda a sua colaboração. Com toda certeza você tornou mais descontraídos e leves os momentos de experimento no laboratório. Agradeço por todos os apontamentos e dicas científicas, conversas e momentos de convivência durante os experimentos. Obrigada pela sua amizade e sua dedicação.

Ao Dr. Leonardo Seito por todo auxílio e participação inicial no meu projeto. Obrigada pela sua amizade e dedicação.

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia Aplicada, por ter me recebido de braços abertos, por todo o aprendizado que me ofereceram, por todo o incentivo e apoio a seguir a carreira acadêmica, e por me ajudarem de forma direta ou indireta a desenvolver este trabalho. Em especial: às minhas amigas/irmãs de laboratório, a Dra. Letícia Massimo, Pamela Real, Msc. Sarah Neves, Soraya de Oliveira, Msc. Thalita Ferraz e Msc. Thamiris Lima, vocês foram essenciais do início ao fim deste trabalho. Agradeço pelos momentos exaustivos de experimento e, principalmente por sempre estarem disponíveis todas as vezes que precisei, inclusive abrindo as portas das casas de vocês e me tornando parte da família de cada uma. Obrigada pela grande amizade, incentivo, apoio, parceria e por sempre dizerem: “Vai dar tudo certo, confia!” e estarem ao meu lado fazendo dar certo;

À todas as alunas de Provoc, Alice Braga, inserida no projeto desta dissertação, você foi excepcional em todos os momentos em que precisei durante o ciclo do mestrado. Muito obrigada por todo seu auxílio fundamental, parceria e animação em todos os momentos. À Gabrielle Torezani e Julia Alencastre, por todo auxílio e colaboração. Tê-las como minhas alunas e orientá-las durante o Programa de Vocação Científica foi uma experiência riquíssima para mim tanto profissional como pessoal;

À todos os profissionais do biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada, o veterinário Ubirajara de Albertim Ribeiro e os técnicos Suelen de Oliveira e Alan, pelo constante cuidado com os animais utilizados experimentalmente, sem a ajuda de vocês parte dos resultados deste trabalho seria inviável;

A todas as pessoas do prédio de Produtos Naturais em Farmanguinhos pelo bom relacionamento e eventual ajuda. Em especial: à Msc. Maria do Socorro e ao Msc. Marcos Jun pelo auxílio com o liofilizador e por sempre estarem disponíveis em ajudar.

A realização deste projeto de pesquisa só foi possível com o apoio da rede de colaboradores. Deste modo, agradeço à Dra. Andrea Henriques Pons do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz e ao Dr. André Sampaio do Laboratório de Farmacologia Molecular de Farmanguinhos/Fiocruz pelo auxílio nos ensaios de citometria de fluxo presente neste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão. Ao Dr. João Moraes e a Dra. Carolinne Amorim do Laboratório de Biologia Redox da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela consultoria para o desenvolvimento dos ensaios de *Western Blotting* com neutrófilos humanos;

À UFRJ por ter me proporcionado a experiência de aprender com grandes mestres a arte da docência que foi fundamental para a minha construção como profissional. Em especial, as Prof^{as} Dra. Alessandra Souza e Bárbara Vieira pelo brilho nos olhos nas aulas e por serem profissionais brilhantes. A dedicação e profissionalismo de vocês me é uma inspiração!

À Dra. Simone Vargas por ter aceito fazer a leitura prévia da minha dissertação. Obrigada por sua disponibilidade para corrigir o meu texto com atenção e contribuir grandemente;

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGB), em especial ao Stenio por sempre ser solícito em me ajudar com a parte burocrática inerente a pós-graduação;

Aos meus pais, Eloisa e Pedro (*in memoriam*), pois sem todo o investimento educacional feito por vocês eu não teria jamais chegado até aqui. Agradeço por todo o sacrifício que fizeram por mim, mas sempre repletos de amor, carinho, paciência, atenção, apoio, atitudes e com as palavras mais acertadas sempre que precisei. Muito obrigada pelo amor incondicional a mim oferecido sempre!

Ao meu irmão, João Pedro, por nunca deixar eu chorar sozinha e por ter estado ao meu lado como fã número 1. E a toda a minha família por todo incentivo e apoio aos meus sonhos, sempre acreditando que eu era capaz. Em especial: ao vô Aloísio, por sempre apoiar a minha educação e por sempre acreditar que eu posso conquistar absolutamente tudo. Te amo, vô!

À Cristiane Braga e Telma Frutuoso, minhas segundas mães, por toda a dedicação, carinho, amor, incentivo, apoio, colo e amizade. Muito obrigada dindas!

Às minhas grandes amigas Ana Elisa Macedo, Erika Farias, Isabela Salomão, Larissa Guedes, Luana de Jesus, Maira Haddad, Marina e Vitória Accioly por independentemente de onde eu esteja e independente do momento, seja ele o melhor ou principalmente o pior, sempre darem um jeito de estar comigo! E por aguentarem meu grande estresse no período de escrita e sempre me darem forças para continuar. Muito obrigada por tanto e por tudo!

Às agências de fomento CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro, e a todas por estimularem a pesquisa, ensino e extensão.

À banca, de antemão, por aceitar avaliar o meu trabalho e contribuir positivamente para a sua finalização.

Por fim, muito obrigada a todos vocês!

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de
compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

CORREA, Aryella Maryah Couto. **Estudo dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos durante a lesão aguda pulmonar induzida por malária.** 2024. f. 142 Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A resposta inflamatória desempenha um papel crucial na progressão das manifestações graves na malária. Nesse contexto, os neutrófilos são células-chave no desenvolvimento da lesão pulmonar associada à malária (MA-ALI/ARDS), sendo considerados como alvos para a atenuação de processos inflamatórios infecciosos. Os receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁R) e tipo 2 (CB₂R) têm sido investigados como possíveis alvos terapêuticos anti-inflamatórios. Embora estudos tenham abordado a modulação desses receptores no sistema imune-inato, especialmente em neutrófilos, os mecanismos de ativação dessas células pelos receptores CB₁ e CB₂ ainda não foram completamente elucidados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da modulação dos receptores canabinoides na ativação de neutrófilos e no desenvolvimento da malária grave pulmonar. Nossos resultados demonstraram que a ativação do CB₂R, através de seu agonista seletivo, JWH133 (10 µM), em neutrófilos humanos estimulados *in vitro* com IL-8 (25 ng/mL), induziu significativa redução na migração e na liberação de mediadores inflamatórios (NO e TNF-α). Além disso, a ativação do CB₂R inibiu a liberação de NETs e EROs em neutrófilos estimulados com PMA (5 nM). Em contrapartida, a ativação do CB₂R em neutrófilos estimulados com TNF-α (10 ng/mL) e IL-8 (25 ng/mL) resultou no aumento da liberação de NETs e EROs, bem como indicou um possível aumento da sobrevivência desses neutrófilos. Esses resultados sugerem que as ações decorrentes da ativação do CB₂R são estímulo-dependentes. Em experimentos *in vivo*, a infecção por *P. berghei* NK65 foi associada ao aumento na produção de mediadores inflamatórios, como TNF-α e CXCL-1/KC, e à promoção da ativação e efluxo de neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea. Análises *ex vivo* revelaram maior quimiotaxia em neutrófilos isolados de animais infectados, enquanto o plasma desses animais induziu a quimiotaxia de neutrófilos. O pré-tratamento com JWH133 (0,25, 0,5 e 1 mg/kg) em camundongos C57/BL6 infectados por *P.berghei* NK65 não alterou a parasitemia. No entanto, a dose de 0,5 mg/Kg aumentou o peso relativo do pulmão e a contagem de leucócitos totais periféricos, apesar de reduzir o edema pulmonar. Por sua vez, a dose de 0,25 mg/Kg reduziu a contagem de neutrófilos circulantes. Esses resultados indicam que o JWH 133 parece modular alguns parâmetros da malária grave pulmonar e o influxo de neutrófilos para o sangue periférico. Em conjunto, nossos dados ressaltam a importância da ativação do CB₂R nas ações efetoras de neutrófilos isolados e durante o desenvolvimento da malária grave pulmonar experimental.

Palavras-chave: MA-ALI/ARDS; inflamação; neutrófilos; receptores canabinoides.

Abstract

CORREA, Aryella Maryah Couto. *Study of cannabinoid receptors in the activation of neutrophils during acute lung injury caused by malaria*. 2024. f. 412 Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

The inflammatory response plays a crucial role in the progression of severe manifestations in malaria. Neutrophils are key cells in the development of malaria-associated lung injury (MA-ALI/ARDS) and are considered targets for attenuating infectious inflammatory processes. Type 1 (CB1R) and type 2 (CB2R) cannabinoid receptors have been investigated as possible anti-inflammatory therapeutic targets. Although studies have addressed the modulation of these receptors in the innate immune system, especially in neutrophils, the mechanisms of activation of these cells by CB1 and CB2 receptors have not yet been completely elucidated. The objective of this work was to evaluate the impact of modulating cannabinoid receptors on the activation of neutrophils and the development of severe pulmonary malaria. Our results demonstrate that the activation of CB2R, through its selective agonist, JWH133 (10 μ M), in human neutrophils stimulated *in vitro* with IL-8 (25 ng/mL), induced a significant reduction in migration and the release of inflammatory mediators (NO and TNF- α). Furthermore, CB2R activation inhibited the release of NETs and ROS in neutrophils stimulated with PMA (5 nM). In contrast, CB2R activation in neutrophils stimulated with TNF- α (10 ng/mL) and IL-8 (25 ng/mL) resulted in increased release of NETs and ROS, as well as indicating a possible increase in the survival of these neutrophils. These results suggest that the actions resulting from CB2R activation are stimulus dependent. In *in vivo* experiments, *P. berghei* NK65 infection was associated with increased production of inflammatory mediators, such as TNF- α and CXCL-1/KC, and the promotion of neutrophil activation and efflux from the bone marrow into the bloodstream. *Ex vivo* analysis revealed greater chemokinesis in neutrophils isolated from infected animals, while plasma from these animals induced neutrophil chemotaxis. Pretreatment with JWH133 (0.25, 0.5, and 1 mg/kg) in C57/BL6 mice infected by *P. berghei* NK65 did not change parasitemia. However, the dose of 0.5 mg/kg increased the relative lung weight and total peripheral leukocyte count, despite reducing pulmonary edema. In turn, the dose of 0.25 mg/kg reduced the circulating neutrophil count. These results indicate that JWH133 appears to modulate some parameters of severe pulmonary malaria and the influx of neutrophils into peripheral blood. Taken together, our data highlight the importance of CB2R activation in the effector actions of isolated neutrophils and during the development of severe experimental pulmonary malaria.

Keywords: MA-ALI/ARDS; inflammation; neutrophils; cannabinoid receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Receptores e vias de sinalização envolvidos no processo de NETose	32
Figura 2	Mecanismos de formação de NETs lítica e não lítica	34
Figura 3	Papel dos neutrófilo na patologia da malária	42
Figura 4	Vias de sinalização mediadas pela ativação de CB ₁ e CB ₂	44
Figura 5	Desenho experimental	61
Figura 6	Análise da expressão dos receptores canabinoides em neutrófilos	67
Figura 7	Estratégia de gate para avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos após o pré-tratamento com concentrações crescentes dos agonistas ou antagonistas CB ₁ e CB ₂ e estimulados com IL-8	69
Figura 8	Estudo concentração-resposta do pré-tratamento com o agonista do receptor CB ₁ (ACEA) sobre a NETose de neutrófilos humanos induzida por PMA	71
Figura 9	Efeito do receptor CB ₂ sobre a NETose de neutrófilos humanos induzida por PMA	72
Figura 10	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na intensidade de liberação de EROs por neutrófilos humanos estimulados com PMA	74
Figura 11	Avaliação da quimiotaxia de neutrófilos pré-tratados com concentrações crescentes de agonistas ou antagonistas CB ₂ e estimulados com IL-8.....	75
Figura 12	Avaliação da especificidade de ação do receptor CB ₂ sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos induzida por IL-8	76
Figura 13	Envolvimento do receptor CB ₂ na produção de mediadores inflamatórios em neutrófilos estimulados com IL-8	77
Figura 14	Cinética da indução de NETose por diferentes estímulos	79
Figura 15	Avaliação do papel do receptor CB ₂ sobre o processo de NETose de neutrófilos humanos induzida por TNF- α e IL-8 ...	81

Figura 16	Avaliação da liberação de EROs induzida por diferentes estímulos	83
Figura 17	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de EROs por neutrófilos humanos estimulados com TNF- α e IL-8	85
Figura 18	Cinética da avaliação de apoptose e morte espontânea de neutrófilos via Anexina V/PI estimulados com diferentes estímulos	87
Figura 19	Avaliação da porcentagem de neutrófilos viáveis via Anexina V/PI após 20 horas de estimulação	89
Figura 20	Caracterização do modelo de infecção por <i>P.berghei</i> NK65 ...	91
Figura 21	Estudo sobre o influxo de leucócitos circulantes e produção de mediadores inflamatórios no decorrer da infecção por <i>P.berghei</i> NK65	92
Figura 22	Avaliação do papel de CXCL-1/KC na migração de neutrófilos medulares no decorrer da infecção por <i>P.berghei</i> NK65	94
Figura 23	Avaliação do efluxo e ativação de neutrófilos da medula no decorrer da infecção por <i>P. berghei</i> NK65	96
Figura 24	Avaliação do papel da ativação do receptor CB ₂ na infecção por <i>P. berghei</i> NK65	97
Figura 25	Avaliação do papel da ativação do receptor CB ₂ no desenvolvimento da lesão aguda pulmonar e influxo de leucócitos circulantes induzidos por <i>P.berghei</i> NK65	99
Figura 26	Dot plots representativos da avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos após o pré-tratamento com concentrações crescentes dos agonistas ou antagonistas CB ₁ e CB ₂ e estimulados com IL-8	130
Figura 27	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de EROs por neutrófilos humanos estimulados com PMA (5 nM)	131
Figura 28	Avaliação da liberação de EROs induzida por diferentes estímulos	135
Figura 29	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de EROs por neutrófilos humanos estimulados com TNF- α e IL-8	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Viabilidade celular de neutrófilos humanos pelo ensaio LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain) na presença dos agonistas ou antagonistas dos receptores CB ₁ e CB ₂ e rh IL-8 (25 ng/mL)	70
Tabela 2	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na porcentagem de neutrófilos humanos produtores de EROs estimulados com PMA	73
Tabela 3	Investigação sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos estimulados por TNF- α e/ou IL-8	82
Tabela 4	Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de EROs por neutrófilos humanos estimulados com TNF- α e IL-8	84
Tabela 5	Peso relativo dos órgãos de camundongos C57BL/6J após 8 dias da administração diária intraperitoneal (i.p) de JWH133.....	98
Tabela 6	Avaliação do papel do agonista receptor CB ₂ , JWH133, sobre o processo de NETose de neutrófilos humanos induzida por TNF- α e IL-8	132
Tabela 7	Avaliação do papel do antagonista receptor CB ₂ , SR144528, sobre o processo de NETose de neutrófilos humanos induzida por TNF- α e IL-8	133
Tabela 8	Avaliação da integridade de membrana de neutrófilos humanos por quantificação de LDH liberado após pré-tratamento com agonista ou antagonista do receptor CB ₂ e estimulados com TNF- α e IL-8 por 4 horas	134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estímulos e suas concentrações (<i>in vitro</i>)	52
Quadro 2	Agonistas e antagonistas dos receptores CB ₁ e CB ₂	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEA	Anandamida
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida- canabinoide sintético agonista de receptor canabinoide 1
ALI	lesão pulmonar aguda, do inglês <i>acute lung injury</i>
AM6545	canabinoide sintético antagonista de receptor canabinoide 1
AM630	canabinóide sintético antagonista de receptor canabinoide 2
AMD3100	inibidor seletivo do receptor de quimiocina CXCR4
AMPC/ cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
APS	Persulfato de amônio, do inglês <i>ammonium persulfate</i>
ARDS	síndrome do desconforto respiratório agudo, do inglês <i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	adenosina trifosfato
2-AG	2- araquidonoil glicerol
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
BCP	β - cariofileno
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CB	receptor canabinoide
CB1/ CB1R	receptor canabinoide do tipo 1
CB2/ CB2R	receptor canabinoide do tipo 2
CB2 ^{-/-}	nocaute para receptor canabinoide 2
CBD	canabidiol
CCL2/ MCP-1	ligante 2 de CC-quimiocina / Proteína quimioatratante de monócitos, do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
CCL3	ligante 3 de CC- quimiocina
CCL4	ligante 4 de CC- quimiocina
CCL5/	ligante 5 de CC-quimiocina ou regulada por ativação, célula T
RANTES	normal, expressa e secr, do inglês
CCL17	ligante 17 de CC- quimiocina
CLP	ligadura e punção cecal, do inglês <i>cecal ligation and punctura</i>
CLRs	receptores de lectina tipo C

CO ₂	dióxido de carbono
CXCL1/KC	ligante 1 de CXC-quimiocinas/ quimiocina derivada de queratinócito
CXCL2/ MIP- 2	ligante 2 de CXC-quimiocinas/ proteína inflamatória de macrófagos 2
CXCL10	ligante 10 de CXC-quimiocinas
CRs	receptores complemento
DHR	Dihidrorodamina
ddp	Diferença de potencial
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DTT	Ditioltreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra acético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular do inglês, <i>extracellular signal regulated kinases</i>
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial (NOS 3)
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
FITC	Isotiocinato de fluorescência, do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
fMLP	N- formilmetionil- leucil- fenilalanina
G _{ai/o}	proteína G inibitória subunidade alfa, família de subunidades alfa da proteína G heterotrimérica
G _{ai}	proteína G inibitória subunidade alfa
G _{as}	proteína G estimulatória subunidade alfa
G _{aq}	proteína G responsável pela ativação da enzima fosfolipase C subunidade alfa
G- CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GDP	guanosina difosfato

G- GIRK	canais de potássio retificadores internos acoplados a proteínas G
GIRK	proteína G acoplada a canais de potássio retificadores internos
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
GPR	receptor acoplado à proteína G
GTP	guanosina trifosfato
GTPases	família de enzimas hidrolases que se ligam ao nucleotídeo guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina balanceada de Hank's, do inglês <i>Hank's balanced salt</i>
HEPES	N- (2-hidroxietil) piperazina- N'- etanosulfônico
HU308	Canabinoide sintético, agonista seletivo para receptor canabinoide 2
ICAM- 1	Molécula de adesão intercelular 1 do inglês, <i>intercellular cell adhesion molecule 1</i>)
IFN- γ	interferon gama
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
IL-1α	interleucina 1 alfa
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-17	interleucina 17
IL-23α	interleucina 23 alfa
IL-23	interleucina 23
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
JNK	quinase N- terminal-c-Jun
JWH133	Dimetilbutil-desoxi-delta-8-THC- canabinoide sintético seletivo para receptor canabinoide 2

LXA ₄	Lipoxina A ₄
LPS	lipopolissacarídeo
LTB ₄	leucotrieno B ₄
MA-ALI	lesão pulmonar aguda associada a malária
MA-ALI/ARDS	Lesão pulmonar aguda/ síndrome do desconforto respiratório agudo associado a malária
MAPK	proteínas-quinase ativadas por mitógeno, do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i>
MIF	Mediana da intensidade de fluorescência
MMP-9	metaloproteinase de matriz extracelular 9
MPO	mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da saúde
NADPH oxidase/ NOX	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NE	Elastase neutrofílica, do inglês <i>neutrophil elastase</i>
NETs	armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês <i>neutrophils extracellular traps</i>
NF-κB	Fator nuclear – kappa B, do inglês <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>natural killers</i>
NLR	Receptor do tipo NOD, do inglês <i>NOD-like receptor</i>
Nlrp3	NLR contendo o domínio de pirina 3, do inglês <i>NLR Pyrin Domain Containing 3</i>
NP-40	<i>Nonidet P- 40</i>
NO	óxido nítrico, do inglês <i>Nitric oxide</i>
NO ₂	Nitrito
O ₂	Oxigênio
OPD	Ortofenilenediamina, do inglês <i>Orthophenylenediamine</i>
p38	proteína quinase ativadas por mitógenos p38
PAD4	peptidil arginina deiminase 4
PAF	fator agregador de plaquetas, do inglês <i>platelet- activating factor</i>
PBS 1X	Solução salina tamponada com fostato, do inglês <i>Phosphate buffer saline</i>

PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbNK65	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PfEMP1	Proteínas de membrana do eritrócito 1 de <i>P. falciparum</i> do inglês, <i>P.falciparum erythrocyte membrane proteins</i>
PI	Iodeto de propídio
PI3K	fosfatidilinositol – 3- quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PMA	Forbol 12- miristato 13- acetato, do inglês <i>phorbol 12-myristate 13- acetate</i>
PPAR-γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma- γ, do inglês <i>Peroxisome proliferator- activated receptor - γ</i>
PMNs	polimorfonucleares
pPbNK65	plasma de animal infectado com <i>Plasmodium berghei</i> NK65
pNI	plasma de animal não infectado
rhDNAse	Dnase recombinante humana
Rho	família de pequenas proteínas G sinalizadoras e é uma subfamília da superfamília Ras
RhoA	gene ativador de proteínas, membro A da família homóloga Ras
SFB	Soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SR144528	canabinoide sintético antagonista para receptor canabinoide 2
Δ-9-THC / THC	delta-9-tetrahidrocanabinol
TGF-β	Fator de crescimento transformante- β, do inglês <i>transforming growth factor - β</i>
Tlr ou TLR	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i>
Tlr2 ou TLR-2	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 2, do inglês <i>toll-like receptor 2</i>
Tlr4 ou TLR-4	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 4, do inglês <i>toll-like receptor 4</i>

Tlr6 ou TLR-6	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 6, do inglês <i>toll-like receptor 6</i>
Tlr7 ou TLR-7	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 7, do inglês <i>toll-like receptor 7</i>
Tlr8 ou TLR-8	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 8, do inglês <i>toll-like receptor 8</i>
Tlr9 ou TLR-9	receptor de reconhecimento de patógenos do tipo <i>toll</i> 9, do inglês <i>toll-like receptor 9</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral- alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor α</i>
VGCC	canais de cálcio dependentes de voltagem
VEGF- A	fator de crescimento endotelial vascular A
WIN55212-2	canabinóide sintético agonista para receptor canabinoide 1 e 2
WHO	Organização mundial da saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
WT	Selvagem, do inglês <i>wild type</i>

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μM	Micromol
pg	Picograma
ng	Nanograma
μg	Micrograma
mL	Mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	24
1.	OBJETIVOS	48
1.1.	Objetivo geral	48
1.2.	Objetivos Específicos	48
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1.	Aspectos éticos	49
2.1.1.	<u>Voluntários</u>	49
2.1.2.	<u>Animais</u>	49
2.2.	Materiais	49
2.3.	Isolamento de neutrófilos humanos periféricos	50
2.3.1.	<u>Processo de liofilização para manutenção de estabilidade dos sobrenadantes das culturas e extrato celular dos neutrófilos humanos periféricos</u>	51
2.3.2.	<u>Análise da expressão dos receptores CB₁ e CB₂ por Western Blotting em neutrófilos incubados com diferentes estímulos</u>	52
2.3.3.	<u>Avaliação da viabilidade dos neutrófilos pelo ensaio de Lactato desidrogenase (LDH)</u>	53
2.3.4.	<u>Avaliação da viabilidade dos neutrófilos pré-tratados com agonistas e antagonistas CB₁ ou CB₂ e estimulados por IL-8 pelo “kit LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain”</u>	55
2.3.5.	<u>Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos humanos periféricos por Transwell</u>	55
2.3.6.	<u>Quantificação de citocinas e quimiocinas produzidos por neutrófilos humanos periféricos por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay)</u>	56
2.3.7.	<u>Dosagem de óxido nítrico produzidos por neutrófilos humanos periféricos pelo método de Griess modificado</u>	57
2.3.8.	<u>Avaliação da produção de EROs por neutrófilos humanos pela marcação de dihidrorodamina 123 (DHR)</u>	57
2.3.9.	<u>Avaliação da NETose de neutrófilos humanos por SYTOX™-Green</u>	58
2.3.10.	<u>Avaliação da apoptose e sobrevida pela marcação de Anexina V/ PI</u>	59
2.4.	Infecção por <i>P. berghei</i> NK65	60
2.4.1.	<u>Tratamentos</u>	61

2.4.2.	<u>Peso corporal</u>	61
2.4.3.	<u>Sobrevida</u>	61
2.4.4.	<u>Avaliação do edema pulmonar</u>	62
2.4.5.	<u>Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar e no plasma de animais infectados com o <i>PbNK65</i> por ELISA sanduíche (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)</u>	62
2.4.6.	<u>Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico e na medula óssea</u>	63
2.5.	Isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos	64
2.5.1.	<u>Ensaio de quimiocinesia e quimiotaxia de neutrófilos murinos</u>	65
2.6.	Análise estatística	66
3.	RESULTADOS	67
3.1.	Avaliação da modulação dos receptores CB₁ e CB₂ em neutrófilos periféricos humanos	67
3.1.1.	<u>Análise de expressão dos receptores canabinoides em neutrófilos</u>	67
3.1.2.	<u>Efeito dos agonistas e antagonistas dos receptores canabinoides na viabilidade de neutrófilos</u>	67
3.1.3.	<u>Efeito da ativação dos receptores CB₁ e CB₂ sobre a NETose induzida por PMA em neutrófilos humanos</u>	70
3.1.4.	<u>Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos estimulados com PMA</u>	72
3.1.5.	<u>Avaliação da migração induzida por citocina quimiotática, IL-8 e a sua modulação pelo receptor CB₂, em neutrófilos humanos</u>	74
3.1.6.	<u>Avaliação do papel do receptor CB₂ sobre a produção de mediadores inflamatórios por neutrófilos humanos estimulados por IL-8</u>	76
3.1.7.	<u>Avaliação da formação de NETs em neutrófilos humanos induzida por IL-8</u>	77
3.1.8.	<u>Estudo sobre a formação de NETs em neutrófilos humanos induzida por TNF-α e IL-8</u>	78
3.1.9.	<u>Avaliação do efeito da modulação do receptor CB₂ sobre o processo de NETose induzida por TNF-α e IL-8</u>	79

3.1.10.	<u>Investigação sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos estimulados por TNF-α e/ou IL-8</u>	81
3.1.11.	<u>Efeito do pré-tratamento com JWH133 na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos humanos estimulados com TNF-α e IL-8</u>	83
3.1.12.	<u>Avaliação da morte celular em neutrófilos humanos induzida por diferentes estímulos através da marcação com Anexina V/PI</u>	85
3.1.13.	<u>Estudo do efeito do pré-tratamento com JWH133 na sobrevivência de neutrófilos humanos estimulados com PMA ou TNF-α e IL-8</u>	88
3.2.	Investigação sobre a ativação do receptor CB₂ em modelo experimental murino de MA-ALI/ARDS	90
3.2.1.	<u>Caracterização da participação dos neutrófilos e mediadores inflamatórios no desenvolvimento da lesão aguda pulmonar induzida pela infecção do <i>Plasmodium berghei</i> NK65</u>	90
3.3.	Investigação sobre o papel da ativação do receptor CB₂ no desenvolvimento da lesão pulmonar induzida por <i>P.berghei</i> NK65 .	97
4.	DISCUSSÃO	100
	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXO A – Resultados complementares	130
	ANEXO B – Comprovante de aprovação do comitê de ética em pesquisa	137

INTRODUÇÃO

Neutrófilos

Biologia celular dos neutrófilos

Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares produzidos a partir de precursores mieloides de modo contínuo na medula óssea, sendo um processo regulado pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013). O neutrófilo apresenta diferentes fases durante seu processo de maturação, sendo elas: mieloblasto, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastão e por fim, polimorfonuclear segmentado. Os grânulos dos neutrófilos são ricos em proteínas pró-inflamatórias e são classificados como grânulos primários (azurófilos) constituídos por mieloperoxidase (MPO), grânulos secundários que contêm lactoferrina e grânulos terciários (de gelatinase), constituídos por metaloproteinase de matriz 9 (MMP 9) (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013). Além dos grânulos, os neutrófilos contêm vesículas secretoras, que geralmente transportam, primeiramente, moléculas importantes para adesão celular, e por conseguinte os grânulos de gelatinase com proteases que promovem a digestão da membrana basal e/ou matriz extracelular (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013).

Em relação ao seu papel biológico, os neutrófilos são classicamente descritos como a primeira linha de defesa e componente essencial do sistema imune inato. São classicamente descritos como células fagocíticas profissionais em respostas inflamatórias agudas (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013, TSAI, Chang-youh, HSIEH, *et al.*, 2021). Entretanto mais recentemente já existe a compreensão de que os neutrófilos sejam células multipotenciais com uma diversidade de funções biológicas essenciais, além da fagocitose (LIEW, Pei Xiong, KUBES, 2019, TSAI, Chang-youh, HSIEH, *et al.*, 2021).

Dentre as novas ações biológicas descritas em neutrófilos incluem: 1) a produção de diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e/ou fatores de crescimento; 2) a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET), ectossomos, exossomos e 3) trogocitose (troca de membrana) com células vizinhas para modular respostas imunes inatas e adaptativas. Além disso, os neutrófilos apresentam uma heterogeneidade e plasticidade em diferentes contextos inflamatórios, dentre eles:

câncer, doenças autoimunes, doenças reumatóides, cardiovasculares, doenças pulmonares infecciosas e não infecciosas (DENISET, SUREWAARD, *et al.*, 2017, KUBES, 2018, LOOD, BLANCO, *et al.*, 2016, TSAI, Chang-youh, HSIEH, *et al.*, 2021). Também foi descrita a interação dos neutrófilos com outras células não classicamente relacionada a imunidade como plaquetas, células epiteliais e endoteliais, tanto para manutenção da homeostasia, como também em inflamação da mucosa e aterogênese (CHRISTOFFERSSON, VÅGESJÖ, *et al.*, 2012, COLGAN, COMERFORD, *et al.*, 2002, KUBES, 2018). Recentemente, foi observado que a liberação de granulócitos de baixa densidade (LDG) da medula óssea desencadeia reação autoimune sistêmica no lúpus eritematoso sistêmico (LES) (BENNETT, PALUCKA, *et al.*, 2003, DENNY, YALAVARTHI, *et al.*, 2010, TSAI, C, LI, *et al.*, 2019). Evidenciando que na aplicação prática, a identificação de certos fenótipos de neutrófilos pode tornar-se fator prognóstico para o LES (TSAI, Chang-youh, HSIEH, *et al.*, 2021).

A série de novas funções biológicas de neutrófilos descobertas nos últimos anos, modifica o entendimento desse leucócito como uma célula de apenas um fenótipo e de tempo de vida útil curto que desempenha função restrita à eliminação de patógenos no decorrer da resposta imune inata. Diferentes estudos, evidenciam os neutrófilos como um membro importante da rede imunológica e um regulador crucial de processos fisiológicos, de doenças crônicas e da resposta imunológica adaptativa (MANTOVANI, CASSATELLA, *et al.*, 2011, SOEHNLEIN, LINDBOM, 2010, TSAI, Chang-youh, HSIEH, *et al.*, 2021).

Classicamente, na circulação sanguínea, os neutrófilos apresentam meia-vida em média de 6 a 8 horas (CARNEVALE, CEGLIE, *et al.*, 2023). Após a sua ativação e migração para os tecidos, pode ser observada a postergação de seu tempo de vida (CASCÃO, ROSÁRIO, *et al.*, 2010). A vida útil dos neutrófilos pode ser consideravelmente prolongada sob determinadas condições de ativação, como na presença de G-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), interleucina 8 (IL-8) e proteína C reativa, entre outros mediadores pró-inflamatórios (PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021). Entretanto, a morte celular de neutrófilos é um evento indispensável tanto para a manutenção da homeostase, regulando o número de células circulantes, quanto para a resolução da infecção ou inflamação (HASLETT, SAVILL, *et al.*, 1994, MAIANSKI, MAIANSKI, *et al.*, 2004, SAVIL, WYLLIE, *et al.*, 1989). Desempenhando suas funções efectoras, os

neutrófilos podem iniciar diferentes mecanismos de morte celular, dentre eles: a apoptose, necrose e NETose (PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por alterações na estrutura, formato celular, além da condensação de cromatina (KRYSKO, VANDEN BERGHE, *et al.*, 2008, PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021). Este mecanismo de morte celular pode ocorrer por duas vias de sinalização distintas: a via apoptótica intrínseca ou extrínseca (PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021).

No processo de morte por necrose, em contraste com a apoptose, é observado um aumento de volume celular; descontinuidade da membrana plasmática e liberação de material intracelular; moderada condensação da cromatina; e não é observada a ativação de caspases (BERGHE, VANLANGENAKKER, *et al.*, 2010, FESTJENS, VANDEN BERGHE, *et al.*, 2006, GOLSTEIN, KROEMER, 2006, PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021). Geralmente os participantes do processo de necrose, são os íons Ca^{2+} e as EROs revisto por (PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021). Entretanto, células necróticas liberam fatores imunomoduladores que promovem a perpetuação do processo inflamatório e por este motivo é um tipo de morte que deve ser evitado (LI, Ming, CARPIO, *et al.*, 2001, PÉREZ-FIGUEROA, ÁLVAREZ-CARRASCO, *et al.*, 2021).

A NETose, que consiste no processo de liberação de armadilhas extracelulares por neutrófilos, foi descrito pela primeira vez no trabalho de Takei e colaboradores (TAKEI, ARAKI, *et al.*, 1996) como uma forma especial de morte celular programada e caracterizada pela extrusão do DNA em forma de teia com componentes granulares (proteínas citolíticas) (BRINKMANN, REICHARD, *et al.*, 2004, VOROBJEVA, CHERNYAK, 2020). A NETose é uma das últimas estratégias dos neutrófilos na contenção de agentes infecciosos e na restrição do processo inflamatório para que não atinja os tecidos adjacentes (BRINKMANN, REICHARD, *et al.*, 2004).

Migração de neutrófilos

A maturação de neutrófilos e sua liberação na corrente sanguínea é regulada principalmente pela expressão dos genes que codificam os receptores CXCR4 e CXCR2 (EASH, GREENBAUM, *et al.*, 2010, HIDALGO, CHILVERS, *et al.*, 2019). No processo de maturação dos neutrófilos, a expressão do CXCR4 é regulada negativamente, enquanto a expressão do CXCR2 é aumentada. Além disso, a presença abundante de CXCL2 na circulação desencadeia o efluxo de neutrófilos, da medula óssea para o sangue periférico (HIDALGO, CHILVERS, *et al.*, 2019). Os neutrófilos maduros, majoritários na circulação, expressam os receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2 e a presença de seus ligantes são fundamentais para o recrutamento de neutrófilos para os tecidos inflamados (CAPUCETTI, ALBANO, *et al.*, 2020).

A quimiotaxia foi descrita como um movimento guiado de células em resposta a sinais químicos liberados a partir de uma fonte distante (PETRI, SANZ, 2018). A quimiotaxia de neutrófilos pode ser sumarizada por três processos diferentes: 1) detecção de gradiente; 2) polarização; e 3) motilidade celular (IGLESIAS, DEVREOTES, 2008) que pode ser induzida por diferentes quimioatraentes de diversas origens. Os neutrófilos possuem receptores para quimioatraentes que podem ser divididos em quatro famílias: lipídeos (principalmente, fator agregador de plaquetas - PAF e, leucotrieno B₄ - LTB₄); peptídeos N-formilados (*N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* - fMLP); anafilotoxinas do complemento (componente complemento 5a - C5a) e quimiocinas (ligantes de quimiocinas CXC - CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2 e CXCL8/IL-8) (KRAUS, GRUBER, 2021, PETRI, SANZ, 2018). Dentre os diferentes quimioatraentes de neutrófilos observa-se tanto moléculas endógenas como: C5a, LTB₄ e CXCL8, produtos liberados durante respostas inflamatórias, como também moléculas exógenas, como fMLP liberado por bactérias (KRAUS, GRUBER, 2021). Independente da sua natureza química, a maioria dos quimioatraentes exerce a sua ação através da sua ligação a receptores específicos acoplados à proteína G (GPCRs), que regulam complexas cascatas de sinalização intracelular (ARRAES, FREITAS, *et al.*, 2006).

Ainda neste contexto, a quimiocina CXCL8 (IL-8) em humanos foi o primeiro fator quimiotático de neutrófilos purificado e clonado molecularmente, sendo considerado um importante ativador e agente antiapoptótico para neutrófilos (DAS, RAJAGOPALAN, *et al.*, 2010, MUKAIDA, 2003). A CXCL8 humana (IL-8) liga-se aos receptores CXCR1/CXCR2 ativando os neutrófilos e desencadeando vias de sinalização acopladas à proteína G e β -arrestina. Agindo em conjunto, essas proteínas orquestram o movimento dos neutrófilos do sangue para o tecido infectado / lesado. Além disso, ambas as vias desempenham papéis importantes e não sobrepostos sobre diferentes ações efetoras de neutrófilos a degranulação e explosão oxidativa (RAJARATHNAM, SCHNOOR, *et al.*, 2019), o que pode propiciar a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (AMULIC, CAZALET, *et al.*, 2012, STILLIE, FAROOQ, *et al.*, 2009). Estudos já demonstraram que a ativação de neutrófilos por CXCL8 causa atraso na apoptose. Além de aumento na produção de citocinas e EROs (DALBONI, ABE, *et al.*, 2013).

Mediadores inflamatórios

Os neutrófilos são reconhecidos tanto por produzir e liberar mediadores, quanto por serem modulados por estes mediadores dentre os quais, tem-se o óxido nítrico (NO) (ABBAS, LICHTMAN, *et al.*, 2019, EVANS, BUTTERY, *et al.*, 1996, SECCO, PARON, *et al.*, 2004). O NO é uma molécula gasosa pequena, que apresenta um tempo de meia-vida curto e é produzida por uma grande diversidade de tipos celulares. Em mamíferos a produção do NO se dá a partir de L-arginina e oxigênio pela família de enzimas, óxido nítrico sintase (NOS). Essa molécula possui uma variedade de papéis fisiológicos e fisiopatológicos bem estabelecido (NOLAN, DIXON, *et al.*, 2008). É descrito na literatura que os neutrófilos humanos expressam todas as três enzimas da família NOS (BRYANT, MEHTA, *et al.*, 1992, DE FRUTOS, SÁNCHEZ DE MIGUEL, *et al.*, 2001, EVANS, BUTTERY, *et al.*, 1996, NOLAN, DIXON, *et al.*, 2008, TSUKAHARA, MORISAKI, *et al.*, 2001), entretanto, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é a única expressa constitutivamente e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) pode ser induzida durante as respostas imunes e inflamatórias por lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas, como TNF- α , IL-1, IFN- γ , α , e β (ALDERTON, COOPER, *et al.*, 2001, KNOWLES, MONCADA, 1994, SECCO, PARON, *et al.*, 2004).

Os neutrófilos quando ativados produzem uma grande quantidade de EROs, resultando em uma mudança no equilíbrio redox, em direção às reações oxidativas, caracterizando um processo chamado de estresse oxidativo (WÓJCIK, GE̘GOTEK, *et al.*, 2021). A grande produção de EROs pelos neutrófilos via enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase pode ser decorrente do processo de fagocitose de patógenos, uma vez que um patógeno quando fagocitado pode ser eliminado por mecanismos dependentes de oxigênio (WÓJCIK, GE̘GOTEK, *et al.*, 2021). As altas taxas de EROs ativam fatores de transcrição, como NF- κ B e Nrf2 o que resulta na redução da biossíntese de proteínas antioxidantes e aumento de fatores pró-inflamatórios e desta forma exacerbam a inflamação e ativação de células imunes (AMBROŻEWICZ, WÓJCIK, *et al.*, 2018, WÓJCIK, BIERNACKI, *et al.*, 2019, WÓJCIK, GE̘GOTEK, *et al.*, 2021).

A habilidade dos neutrófilos de atuar efetivamente em múltiplos processos fisiológicos e patológicos se correlaciona com a sua capacidade de secretar diversas citocinas (TAMASSIA, BIANCHETTO-AGUILERA, *et al.*, 2018). As citocinas são moléculas pequenas (8–26 kD) altamente ativas e sintetizadas, majoritariamente, por células do sistema imunológico. Na homeostase as concentrações de citocinas pró-inflamatórias circulantes são baixas ou indetectáveis, sendo a sua produção estimulada durante reações inflamatórias e imunológicas, (GIERLIKOWSKA, STACHURA, *et al.*, 2022). Além disso, as citocinas modulam diferentes processos, tais quais proliferação, diferenciação e mobilidade celular (GIERLIKOWSKA, STACHURA, *et al.*, 2022). Já é descrito que os neutrófilos são capazes de produzir: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8), fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF- β 1), interleucina 1 (IL-1ra), interleucina 6 (IL-6), interferon alfa (IFN- α), fator estimulador de colônia granulocitárias (G-CSF), fator estimulador de colônia macrófaga (M-CSF), fator estimulador de colônia granulócito – macrófagos (GM-CSF), e interleucina 12 (IL-12) revisto por (TSAI, HSIEH, *et al.*, 2021). Essas citocinas pró-inflamatórias são produzidas e secretadas, em conjunto com enzimas liberadas de grânulos de neutrófilos (incluindo elastase de neutrófilos (NE), mieloperoxidase (MPO), azurocidina, enolase-1 e lisozima) (CASSATELLA, ÖSTBERG, *et al.*, 2019, CHAN, KARIMI, *et al.*, 2021) e, acredita-se que isso contribua para a imunopatogênese da tempestade de citocinas observada em grandes processos inflamatórios.

Mecanismos celulares e moleculares da NETose

Classicamente, a NETose é considerada um processo de morte celular. Entretanto, estudos mais recentes demonstram um processo de NET vital, no qual a viabilidade dos neutrófilos não é comprometida (YIPP, PETRI, *et al.*, 2012, YOUSEFI, MIHALACHE, *et al.*, 2009).

As NETs são compostas por cromatina descondensada que quando liberadas formam estruturas em forma de teias no meio extracelular (PIRES, FELIX, *et al.*, 2016). Através da microscopia eletrônica de varredura foi observado as NETs são compostas por filamentos de DNA de 15 a 17 nm de diâmetro e muitas substâncias esféricas com um diâmetro de cerca de 25 nm, que provavelmente são proteínas nucleares, incluindo histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 (BRINKMANN, REICHARD, *et al.*, 2004, LI, Tiewei, ZHANG, *et al.*, 2020), proteínas granulares dentre elas NE, MPO, catepsina G, defensinas de neutrófilos e proteínas citosólica (como proteínas de ligação ao cálcio S100 A8, A9 e A12, bem como actina e α -actinina) (BRINKMANN, REICHARD, *et al.*, 2004, CHAPMAN, LYON, *et al.*, 2019, PETRETTO, BRUSCHI, *et al.*, 2019, URBAN, ERMERT, *et al.*, 2009). Além disso, outros estudos descrevem MMP-9 (ALBRENGUES, SHIELDS, *et al.*, 2018, CARMONA-RIVERA, ZHAO, *et al.*, 2016), fator tecidual (TF) (KAMBAS, MITROULIS, *et al.*, 2012), fator de von Willebrand (vWF) e fibrinogênio (FUCHS, BRILL, *et al.*, 2010, LI, Tiewei, PENG, *et al.*, 2020) como componentes que podem constituir as NETs.

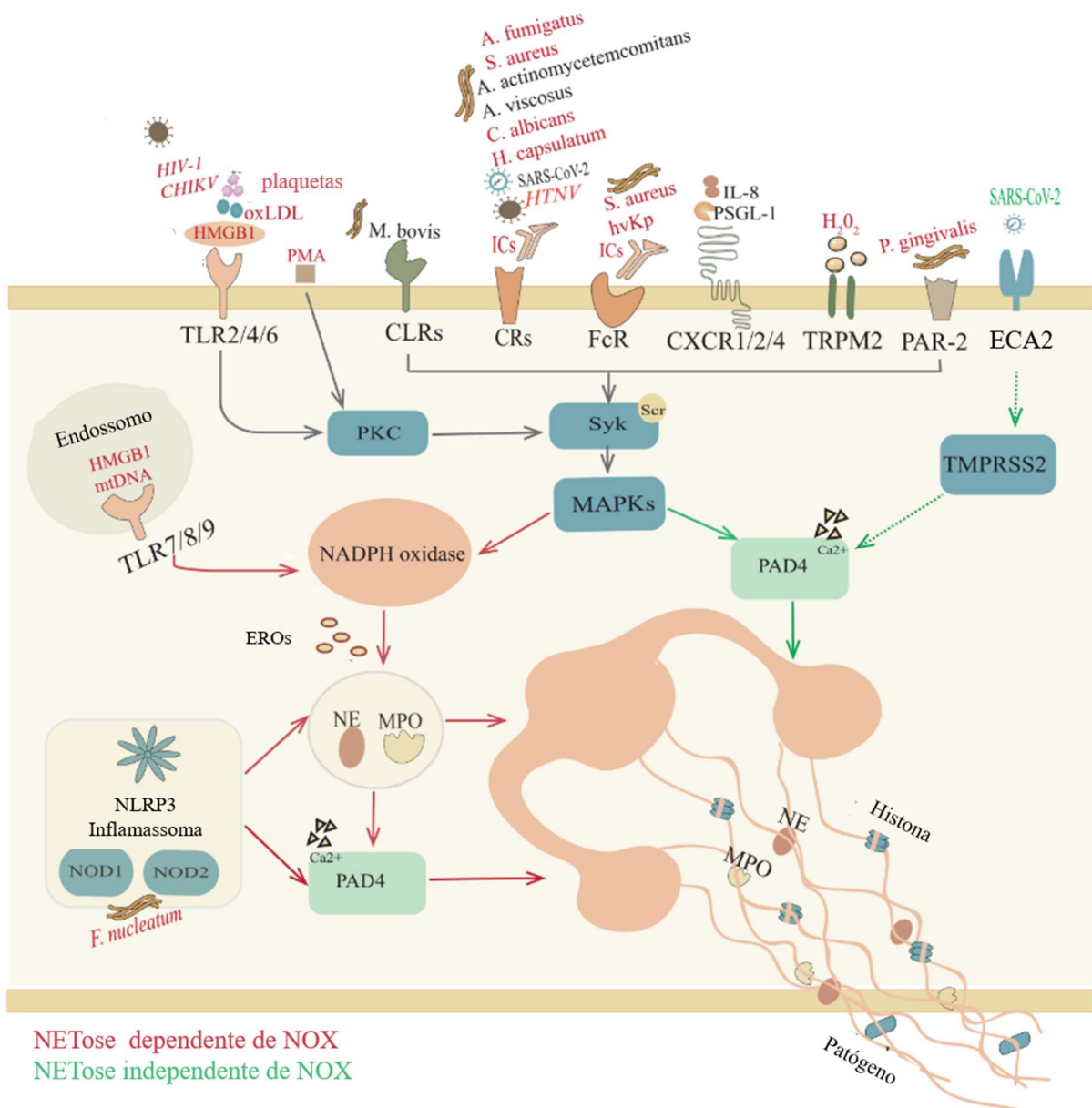
A formação de NETs pode ser induzida por diferentes estímulos de ativação de resposta pró-inflamatória de neutrófilos, dentre eles: i) patógenos, como bactérias, fungos, protozoários, vírus, bem como componentes da parede celular bacteriana, lipopolissacarídeos (LPS); ii) anticorpos e complexos imunes, citocinas e quimiocinas (IL-8, TNF- α) e microcristais (PINEGIN, VOROBJEVA, *et al.*, 2015, VOROBJEVA, PINEGIN, 2014a).

Embora a importância fisiopatológica da NETose já tenha sido demonstrada, os mecanismos celulares da NETose ainda se encontram em processo de elucidação (THIAM, WONG, *et al.*, 2021). Dentre os conhecimentos já obtidos, é sabido que a ativação dos neutrófilos é um pré-requisito para a ocorrência da NETose. O processo se inicia com a ativação de receptores de superfície, ativação das vias de sinalização intracelular e alteração da concentração de cálcio intracelular, promovendo assim a

ativação de cascatas de sinalização de quinase e por consequência produção de EROs (THIAM, WONG, *et al.*, 2021). Os receptores que estão envolvidos na mediação dos mecanismos relacionados aos processos de NETose são os receptores de reconhecimento de padrões, dentre eles receptores do tipo *toll-like*, do tipo *NOD-like*, e lectina do tipo C; receptores do sistema complemento; receptores Fc; receptores de quimiocina (CHEN, LI, *et al.*, 2021) (Figura 1).

A descondensação da cromatina é a principal alteração morfológica que caracteriza e diferencia o processo de NETose em comparação com outros processos de morte celular, tais quais apoptose, necrose ou piroptose (GOLDMANN, MEDINA, 2013, THIAM, WONG, *et al.*, 2021). Acredita-se que este processo seja mediado por modificações pós-traducionais das histonas, dentre eles a clivagem mediada por proteases (PAPAYANNOPOULOS, METZLER, *et al.*, 2010) e a citrulinação mediada por PAD4, sendo esta segunda a mais bem caracterizada (WANG, LI, *et al.*, 2009).

Figura 1: Receptores e vias de sinalização envolvidos no processo de NETose



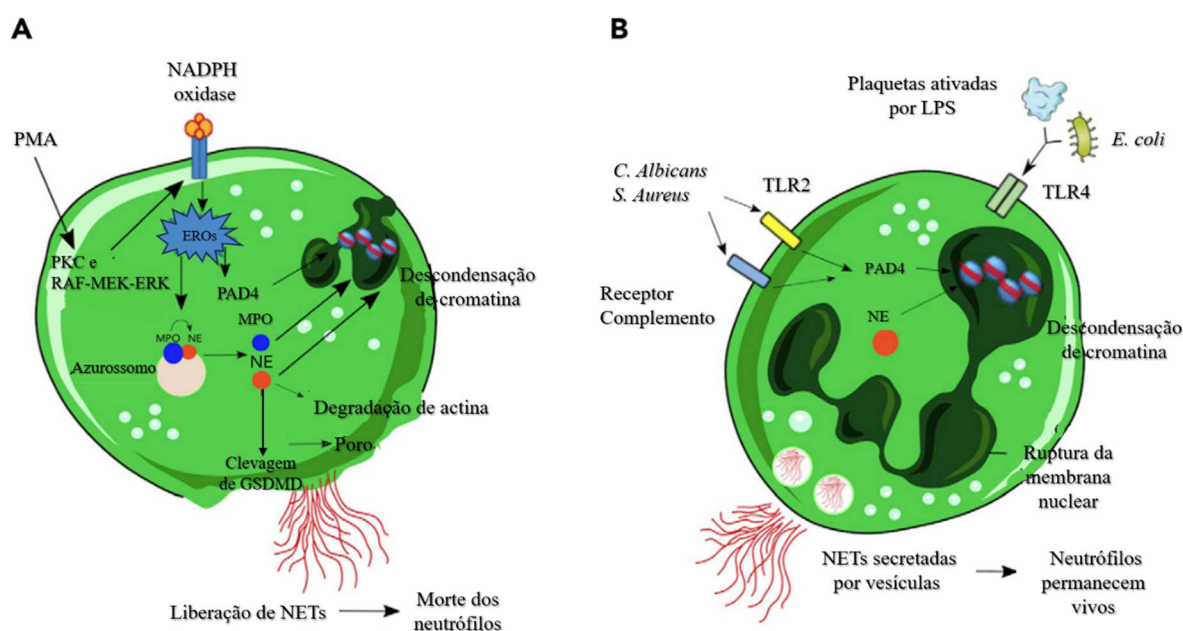
Legenda: Em resposta a diferentes estímulos, os neutrófilos participam de uma resposta através de seus receptores de superfície, incluindo receptores Toll-like (TLRs); receptores de lectina tipo C (CLRs); receptores de complemento (CR); Receptores Fc (FcR); receptores de quimiocinas (CXCRs); receptores do tipo NOD (NOD1/2); potencial receptor transitório melastatina 2 (TRPM2); e receptor-2 ativado por protease (PAR-2), iniciando a sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK) e produzindo EROs, que ativam MPO, NE e PAD4. Posteriormente, NE e MPO ativados são transferidos para o núcleo para promover maior desdobramento da cromatina, destruindo assim a membrana nuclear, que tem como fatores desencadeantes: microrganismos patogênicos, ICs, HMGB1, oxLDL, H₂O₂ e mtDNA, induzem a NETose dependente de NOX. No entanto, na via da NETose independente de NOX, microrganismos patogênicos como a levedura *C. albicans* não opsonizada interage com CLRs (Dectin 2) e o SARS-CoV-2 se liga à enzima de conversão da angiotensina 2 (ECA2) e à protease transmembrana serina 2 (TMPSR2) para ativar o PAD4, que pode levar à citrulinização de histonas e participar da descondensação da cromatina. Posteriormente, a cromatina é liberada no citoplasma, onde é decorada com grânulos e proteínas citoplasmáticas. No entanto, para alguns outros

microrganismos (*M. bovis*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus*), IL-8, ligantes 1 da glicoproteína P-selctina (PSGL-1), ainda não está claro se o mecanismo específico de formação de NET requer EROs. Fonte: Adaptado de (CHEN, LI, *et al.*, 2021).

Diversidade de NETose

Na literatura, já são descritos diversos indutores de NETose *in vitro*, dentre estes os indutores químicos como PMA e peróxido de hidrogênio; os indutores biológicos como citocinas (IL-8; TNF- α ; IL-1 β) e plaquetas ativadas; mensageiros intracelulares como cálcio; produtos bacterianos como LPS e patógenos dentre eles *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *M. bovis*. Diferentes indutores de NETose resultam na ativação de diferentes mecanismos para a sua liberação (Figura 2). Até o presente momento, pelos menos três vias de formação de NET foram hipotetizadas: (1) clássica ou lítica; (2) a vital não lítica mediada por vesículas e, (3) a vital não lítica resultante de DNA mitocondrial (LI, Tiewei, ZHANG, *et al.*, 2020). Na NETose clássica ou lítica: a membrana nuclear é degradada enzimaticamente mediante estimulação externa. A NETose induzida por PMA é um exemplo clássico de NETose lítica, no qual já é descrito que as serinas proteases, NE e MPO, contribuem para descondensação da cromatina e lise celular (PAPAYANNOPOULOS, METZLER, *et al.*, 2010). Na NETose vital - mediada por vesículas, o núcleo do neutrófilo, caracteristicamente lobular, torna-se redondo e a cromatina é uniformemente concentrada. Na sequência a membrana nuclear é rompida e as vesículas envoltas com DNA direcionam-se para a membrana celular com as quais se fundem e a NET é liberada por vesículas. Um agente indutor deste tipo de NETose é a *Staphylococcus aureus* (PILSCZEK, SALINA, *et al.*, 2010). Na NETose vital resultante de DNA mitocondrial, os mecanismos moleculares relacionados ainda não foram elucidados. Os poucos trabalhos presentes na literatura relatam que este processo de NETose é dependente de EROs (KESHARI, JYOTI, *et al.*, 2012, LOOD, BLANCO, *et al.*, 2016, YOUSEFI, MIHALACHE, *et al.*, 2009).

Figura 2: Mecanismos de formação de NETs lítica e não lítica



Legenda: Diferenças entre as vias de sinalização da (A) NETose lítica que resulta na morte do neutrófilo e (B) NETose não lítica, a qual mantém os neutrófilos vivos e com ações efetoras. Fonte: Adaptado de (CASTANHEIRA, KUBES, 2019).

NETose em doenças infecciosas

Em processos inflamatórios infecciosos, as NETs são liberadas visando a defesa do hospedeiro, através do aprisionamento e morte dos microrganismos uma vez que as armadilhas (NETs) apresentaram uma alta concentração de moléculas antimicrobianas aderidas (CASTANHEIRA, KUBES, 2019). Já foi demonstrada a ação das NETs em combate a fungos como o *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* que foram sequestrados pelas NETs liberadas por neutrófilos humanos *in vitro* e por NETs presentes no pulmão de camundongos infectados *in vivo*, respectivamente (BRUNS, KNIEMEYER, *et al.*, 2010, URBAN, REICHARD, *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que as NETs liberadas por neutrófilos expostos a eritrócitos infectados por *Plasmodium spp* no decorrer da infecção contribuíram para o controle da malária, bem como para contenção da disseminação do patógeno (RODRIGUES, PRESTES, GAMA, SILVA, PINHEIRO, RIBEIRO, CAMPOS, ID, *et al.*, 2020).

Malária

Malária grave

A OMS descreve a malária como uma doença potencialmente fatal causada por protozoários, do gênero *Plasmodium spp*, que são transmitidos às pessoas por meio da picada de fêmeas de mosquitos *Anopheles* infectadas (WHO, 2024). Atualmente, são descritas nove espécies de parasitas de *Plasmodium* clinicamente importantes responsáveis pela doença em humanos, sendo elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. brasilianum*, *P. simium* e *P. inui*, em que as cinco últimas são infecções zoonóticas. A infecção por *P. brasilianum*, *P. simium* e *P. inui* ainda que tenham apresentado aumento na detecção ainda são formas de infecção rara (BRASIL, ZALIS, *et al.*, 2017, LALREMRUATA, MAGRIS, *et al.*, 2015, LIEW, Jonathan W K, BUKHARI, 2021, NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022, SINGH, SUNG, *et al.*, 2004, TA, HISAM, *et al.*, 2014). Em contrapartida, o *P. vivax* e principalmente o *P. falciparum* são os responsáveis pelas infecções mais graves, sendo assim as principais causas da manifestação da forma complicada/ grave da doença e morte (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022, OLLIARO, 2008, PRICE, TJITRA, *et al.*, 2007) e (WHO, 2024). Ainda de acordo com a OMS, em 2022, foram estimados 249 milhões de casos e 608 mil mortes por malária evidenciando a sua alta morbidade e mortalidade (WHO, 2024) e (ORGANIZATION, 2023)

As manifestações clínicas e a gravidade da malária vão depender do estado imunológico do hospedeiro, da história de infecção, da virulência do parasita e das variações genéticas tanto no hospedeiro quanto no parasita. Os sintomas podem ser de leves até fatais. Os sintomas leves são febre, calafrios e dor de cabeça, o que dificulta o diagnóstico para malária podendo ser confundido com doenças gripais. Os sintomas graves incluem fadiga, confusão mental, convulsões e dificuldade para respirar (WHO, 2023). De modo geral, as infecções por *Plasmodium* não são complicadas e se resolvem rapidamente com diagnóstico precoce e tratamento imediato com combinações antimaláricas preconizadas (PLUIJM, AMARATUNGA, *et al.*, 2021). Entretanto, caso ocorra um diagnóstico tardio ou incapacidade de eliminar as formas sanguíneas do parasita, propicia as manifestações graves da doença, principalmente, quando a infecção é causada pela espécie *P. falciparum* (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022).

A manifestação clínica da malária grave é ocasionada em decorrência de uma intensa resposta inflamatória sistêmica, provocada por diversos fatores como adesão de leucócitos à microvasculatura dos órgãos, hemácias parasitadas obstruindo o fluxo sanguíneo, e produção exacerbada de mediadores inflamatórios (JR MILNER, 2018, MILNER, VALIM, *et al.*, 2013, MILNER, WHITTEN, *et al.*, 2014). A ativação de células inflamatórias como mononucleares e polimorfonucleares, leva a produção de TNF- α e IL-12, respectivamente (DEROOST, PHAM, *et al.*, 2015, GAZZINELLI, KALANTARI, *et al.*, 2014). As citocinas mencionadas por sua vez, promovem a ativação de outras células do sistema imune inato como as células “*natural killers*” (NK) que produzem interferon- γ (IFN- γ). O resultado da ativação do sistema imune inato e a produção das citocinas, IL-12 e IFN- γ , é uma ampliação na ativação de monócitos e macrófagos resultando em um aumento da fagocitose de hemácias infectadas, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), objetivando a morte do parasita (GOWDA, 2007).

O estabelecimento de intensa resposta inflamatória, acontece em órgãos diferentes e com intensidades variadas. No pulmão especificamente, o agravo da doença pode resultar em desconforto respiratório e edema pulmonar (SOUZA, SILVA, *et al.*, 2013, TAYLOR, HANSON, *et al.*, 2012) tendo a lesão aguda pulmonar (ALI) e síndrome do desconforto respiratório aguda (ARDS) como a manifestação clínica mais grave da malária pulmonar. Em casos fatais de malária foi observado um marcado infiltrado inflamatório no tecido pulmonar em necropsias (MILNER, VALIM, *et al.*, 2013).

Malária grave pulmonar

Durante a malária grave, depois do cérebro, o pulmão é o órgão mais afetado. A disfunção pulmonar desenvolvida decorrente dessa doença, tem como causa a adesão das hemácias infectadas a microvasculatura pulmonar, resultado direto ou indireto da inflamação intravascular (PÁDUA, 2016). Esses eventos resultam em ALI e possivelmente ARDS, uma complicação da malária grave menos caracterizada, em comparação com a malária cerebral mais letal. A letalidade da MA-ALI/ARDS está diretamente relacionada com diversos fatores, dentre eles: a virulência das espécies de *Plasmodium*, condição imunológica, comorbidades, infecções ou distúrbios pré-

existentes, momento e eficácia dos tratamentos administrados e disponibilidade de terapias de manejo respiratório (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022).

Em pacientes que desenvolvem MA-ALI/ARDS é observado edema e redução de função pulmonar (ANSTEY, JACUPS, *et al.*, 2002, MAGUIRE, HANDOJO, *et al.*, 2005). Em cortes pulmonares humanos *post-mortem*, é possível observar alterações histopatológicas como edema pulmonar, inflamação, hemorragias e dano alveolar (TAYLOR, Walter R J, HANSON, *et al.*, 2012). A lesão aguda pulmonar decorrente do agravo da infecção por *Plasmodium spp* resulta em dano epitelial, bem como em infiltrado inflamatório no espaço alveolar, aumento de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos que, quando ativados, promovem a produção e liberação de mediadores inflamatórios, destacando proteases e EROs, levando a amplificação do processo inflamatório e injúria tecidual no pulmão (AITKEN, NEGRI, *et al.*, 2014, DEROOST, TYBERGHEIN, *et al.*, 2013, ORTOLAN, SERCUNDES, *et al.*, 2014). Os altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no soro: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IFN- γ , IP-10/CXCL10 (liga-se a CXCR3) e MCP-1/CCL2 (liga-se a CCR2) revisto por (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022), e níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias, TGF- β (ANDRADE, REIS-FILHO, *et al.*, 2010, NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022), são descritas em quadros de malária grave cerebral em humanos, mas o mesmo não é amplamente conhecido em pacientes com MA-ALI/ARDS devido a grandes limitações.

As citocinas envolvidas no desenvolvimento da MA-ALI/ARDS são descritas a partir de modelos experimentais de malária, nos quais são possíveis as análises dos tecidos pulmonares e do lavado broncoalveolar de camundongos infectados. A análise desses materiais revelou correspondência com citocinas e quimiocinas aumentadas no soro de pacientes com malária grave como: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , MCP-1/CCL2, MIP-2/CXCL2, IP-10/CXCL10, KC/CXCL1, VEGF, PIGF (*placental growth factor*) revisto por (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022). Estas correlações reiteram a importancia dos modelos experimentais em roedores para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na MA-ALI/ARDS, bem como validação de hipóteses e descobertas de possíveis alvos para futuras intervenções (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022). Até o momento, são descritas quatro espécies de *roedores Plasmodium*: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei* que são inoculadas em

diferentes cepas de camundongos para o desenvolvimento e avaliação experimental da MA-ALI/ARDS (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022).

O quadro de lesão pulmonar aguda consequente da malária (MA-ALI) também é observado em modelos experimentais. Animais infectados com *P. berghei* induzem uma resposta inflamatória após 24h da infecção (SOUZA, SILVA, *et al.*, 2013). Essa resposta é caracterizada por um acentuado infiltrado leucocitário, produção de citocinas e quimiocinas pró- inflamatórias no tecido pulmonar (AITKEN, NEGRI, *et al.*, 2014, DEROOST, TYBERGHEIN, *et al.*, 2013, EPIPHANIO, CAMPOS, *et al.*, 2010, SOUZA, Mariana C, SILVA, *et al.*, 2013). A quantidade de hemácias parasitadas nos pulmões determina a dimensão da produção de quimiocinas como proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1/CCL2), ligante 1 de quimiocinas CXC (KC/CXCL1), ligante 5 de quimiocinas CC (CCL5) e ligante 2 de quimiocinas CXC (CXCL2) que estão associadas ao acúmulo de leucócitos no tecido pulmonar (BELNOUE, POTTER, *et al.*, 2008, DEROOST, TYBERGHEIN, *et al.*, 2013, SOUZA, SILVA, *et al.*, 2013, STEEN, GEURTS, *et al.*, 2010, TAYLOR, W. R.J., WHITE, 2002, ZARBOCK, BISHOP, *et al.*, 2010). No infiltrado inflamatório pulmonar além das células mononucleares tem-se a presença de neutrófilos (AITKEN, NEGRI, *et al.*, 2014).

Malária grave pulmonar e neutrófilos

A infecção por malária desencadeia um processo inflamatório caracterizado por um intenso infiltrado leucocitário no parênquima pulmonar (AITKEN, NEGRI, *et al.*, 2014, DEROOST, TYBERGHEIN, *et al.*, 2013). Neste local há íntima interação entre os leucócitos e o endotélio que contribui para patogênese da MA-ALI/SDRA e é um evento comum à infecção em humanos e em animais (SOUZA, SILVA, *et al.*, 2013, TAYLOR, HANSON, *et al.*, 2012).

Nos espaços alveolares e intersticiais do pulmão infectado por *Plasmodium*, os neutrófilos são observados associados a hemácias, monócitos e linfócitos (MACPHERSON, 1985, TAYLOR, Walter R J, HANSON, *et al.*, 2012). Durante muitos anos o papel dos neutrófilos na malária foi negligenciado, entretanto estudos recentes se dedicaram a melhor compreender a participação dessas células no desenvolvimento e agravamento da malária e foram descritas ações protetoras e deletérias revisto por (NGUEE, BARBOZA, *et al.*, 2022). Os neutrófilos têm um papel fundamental na lesão pulmonar decorrente da malária (Figura 3), pois são recrutados

para o pulmão onde liberam EROs, espécies reativas de nitrogênios (ERNs), MPO, mediadores lipídicos, citocinas inflamatórias, elastase de neutrófilos e metaloproteinase de matriz (MMP), podendo resultar em dano epitelial e endotelial (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016).

A análise dos pulmões de paciente infectado com *P. falciparum* grave do sudeste asiático relataram a presença de elastase de neutrófilos e neutrófilos no pulmão, mesmo quando não foi observado o edema pulmonar (AMPAWONG, CHAISRI, *et al.*, 2015). Da mesma forma, análises pós-morte de pulmões de pacientes com MA-ALI/SDRA em decorrência da infecção por *P. vivax* demonstraram edema pulmonar e acúmulo de células inflamatórias nos espaços intersticiais e alveolares, dentre estas células foram identificados os neutrófilos (COSTA, LOPES, *et al.*, 2012, LACERDA, MOURÃO, *et al.*, 2012). Um estudo de coorte indiano, apresentou dados que mostram que no sangue periférico de pacientes com malária grave o número de neutrófilos era maior quando comparado com pacientes com casos de malária não grave (MAHANTA, KAR, *et al.*, 2015).

Já em modelos experimentais murinos, diferentes grupos de pesquisa observaram o aumento dos neutrófilos no lavado broncoalveolar com diferentes cepas de camundongos, cepa de *Plasmodium* e tempos, dentre eles: Sercundes e colaboradores (2016), demonstraram um marcado aumento de neutrófilos em camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) em 7 dias após a infecção (7 dpi) (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016), e Van den Steen e colaboradores (2010), evidenciaram aumento de neutrófilos tanto em camundongos C57BL/6 infectados por *PbA* em 7-8 dpi e C57BL/6 infectados por *Plasmodium berghei* NK65 (*PbNK65*) em 10 dpi (STEEN, GEURTS, *et al.*, 2010).

Objetivando compreender e investigar o papel dos neutrófilos na patogênese da MA-ALI/SDRA, Sercundes e colaboradores (2016) desenvolveram um estudo utilizando camundongo DBA/2 infectado com *PbA*. Os dados revelaram que durante a MA-ALI/SDRA experimental há migração e acúmulo de neutrófilos no pulmão, os quais sintetizam ativamente EROs, MPO assim como NETs (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016). Por outro lado, a depleção dos neutrófilos com AMD3100 (antagonista CXCR4) ou a inibição da formação das NETs com Sivelestat (inibidor da elastase neutrofílica) ou ainda a destruição das NETs com Pulmozyme (DNase

recombinante humana) promoveram melhora nos parâmetros respiratórios, histopatológicos do tecido pulmonar e na sobrevivência dos camundongos reduzindo assim o desenvolvimento da MA-ALI/SDRA. Esses estudos corroboram a hipótese da dependência e do papel essencial de neutrófilos para o estabelecimento da ALI/SDRA decorrente do agravamento da malária (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016).

Existem vários fatores que podem induzir a formação de NET durante infecções por *Plasmodium spp.* Dentre eles pode-se destacar produtos do metabolismo do parasita durante o desenvolvimento da infecção que são acumulados e liberados após a ruptura de hemácias infectadas (DELGADO, TY, *et al.*, 2015). Além disso, outros fatores que podem propiciar a liberação das NETs durante a infecção por *Plasmodium spp.* são as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-8, que estão aumentadas no processo inflamatório infeccioso (DUNST, KAMENA, *et al.*, 2017). O H₂O₂ secretado por células inflamatórias estimuladas pelo parasita também pode contribuir para liberação das NETs, como já demonstrado *in vitro* (HOPPENBROUWERS, AUTAR, *et al.*, 2017, PERCÁRIO, MOREIRA, *et al.*, 2012, VASQUEZ, ZUNIGA, *et al.*, 2021).

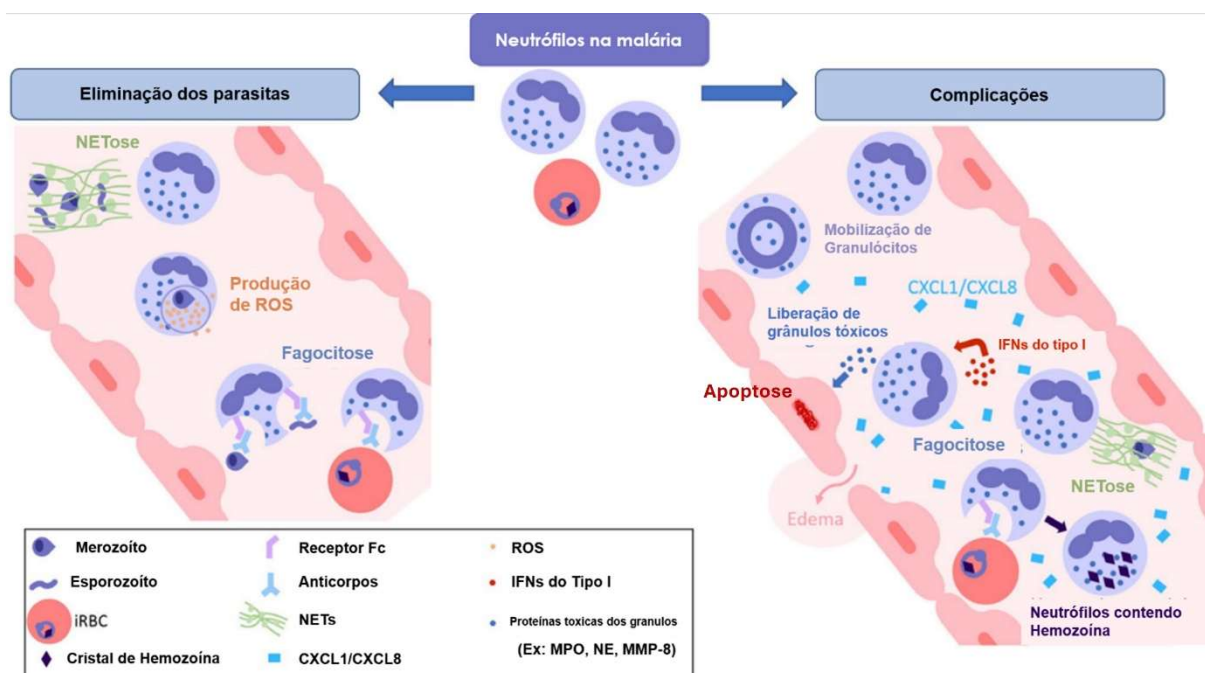
Assim como indicado por Sercundes e colaboradores (2016), na literatura atualmente, já são encontrados outros trabalhos os quais relatam o possível papel das NETs no controle do crescimento de parasitas durante a malária (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016). Dentre eles, Kho e colaboradores (2019), descreveram que a formação de NET foi inversamente proporcional aos níveis de parasitemia em pacientes com malária não complicada (KHO, MINIGO, *et al.*, 2019).

Já em modelos experimentais de malária murina, Rodrigues e colaboradores, observaram que a inibição da NETose pelo uso de Pulmozyme aumentou a parasitemia em camundongos infectados por *PbA* e reduziu a sobrevivência. Por outro lado, o mesmo tratamento não apresentou este efeito na infecção por *P. chabaudi*, quando foi observada uma melhora significativa nos parâmetros histopatológicos no tecido pulmonar (RODRIGUES, PRESTES, GAMA, SILVA, PINHEIRO, RIBEIRO, CAMPOS, COELHO, *et al.*, 2020). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que tanto neutrófilos humanos em resposta a eritrócitos infectados por *P. falciparum*, quanto neutrófilos murinos em resposta a eritrócitos infectados por *PbA* liberam NET em um processo independente de EROs (RODRIGUES, PRESTES, GAMA, SILVA, PINHEIRO, RIBEIRO, CAMPOS, COELHO, *et al.*, 2020).

No contexto da participação de neutrófilos na MA-ALI/ARDS, Sercundes e colaboradores ainda sugerem que os inibidores: AMD3100, Sivelestat e Pulmozyme, considerados imunomoduladores, poderiam ser utilizados como tratamentos adjuvantes aos antimaláricos para prevenir o dano pulmonar em pacientes (SERCUNDES, ORTOLAN, *et al.*, 2016). Essa sugestão corrobora com outros estudos que já demonstraram o tratamento com DNase recombinante humana (rhDNase) previne a formação de NET nos alvéolos, promovendo melhora da função pulmonar e a redução da hipóxia em modelo de lesão pulmonar aguda. Além disso, sabe-se que esse tratamento reduz a ativação e o acúmulo de neutrófilos em pacientes com fibrose cística (THOMAS, CARBO, *et al.*, 2012, VOROBJEVA, PINEGIN, 2014b).

Apesar dos estudos apresentados, os neutrófilos na malária continuam pouco estudados. Até o momento, esses leucócitos desempenham um papel dual e por vezes controversos a depender de diferentes fatores relacionados tanto ao hospedeiro, quanto ao parasita para o estabelecimento do processo inflamatório tão relevante para o agravo da malária.

Figura 3: Papel do neutrófilo na patologia da malária



Legenda: Os neutrófilos desempenham papéis importantes na defesa imunitária contra a malária através da eliminação de parasitas pela fagocitose mediada por anticorpos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e NETose. A mobilização de granulócitos induzida por CXCL1/CXCL8 aumenta o número de neutrófilos na circulação, incluindo neutrófilos imaturos. Os neutrófilos no sítio inflamado liberam grânulos tóxicos contendo mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos (NE) e metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8), que causam danos ao endotélio, resultando em apoptose das células endoteliais e subsequentemente edema. A participação dos neutrófilos envolve também o recrutamento e ativação de neutrófilos induzidos por interferon tipo I (IFN). Fonte: Adaptado de (POLLENUS, GOUWY, *et al.*, 2022).

Sistema endocanabinoide

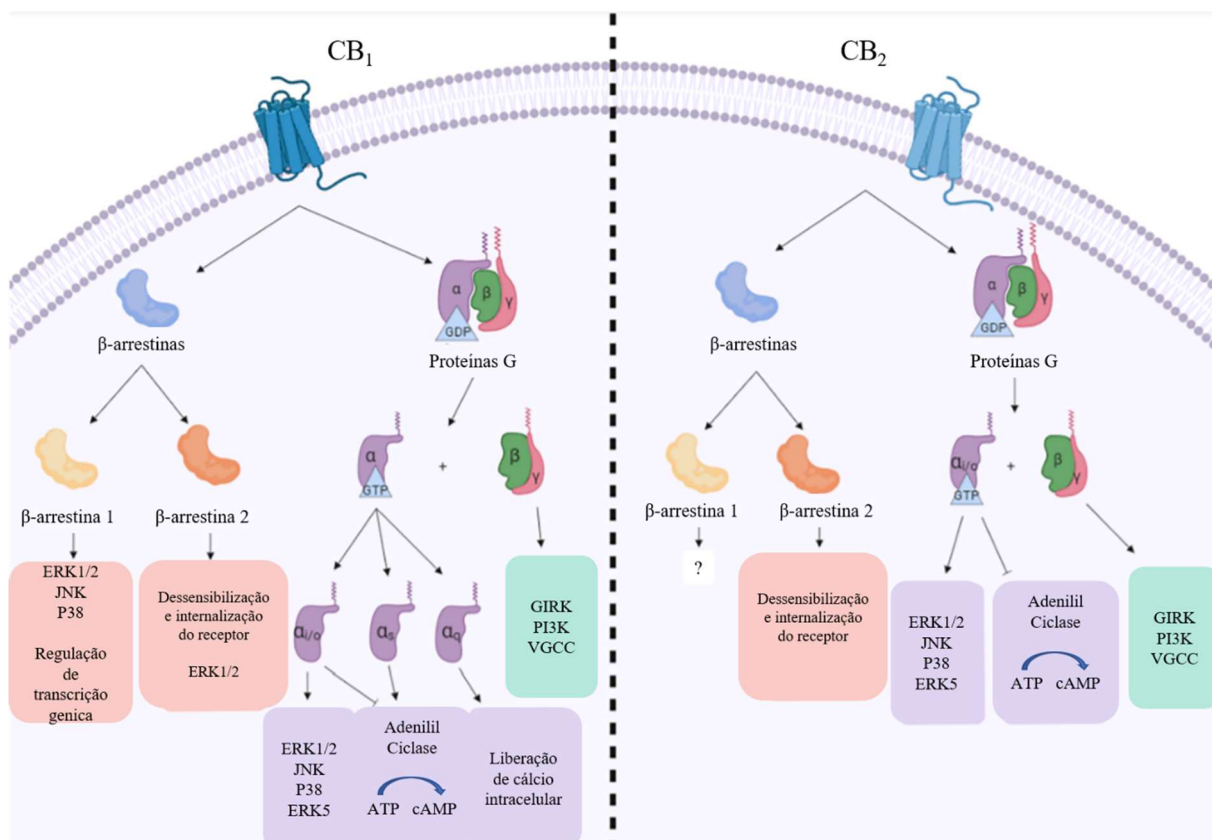
Na década de 1990, a clonagem molecular tornou conhecidos dois receptores de membrana acoplados à proteína G específicos para canabinoides derivados de plantas, como o delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC ou apenas "THC") em células de mamíferos. Esses receptores foram nomeados como receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁R) e do tipo 2 (CB₂R). A presença de receptores de membrana específicos para canabinoides iniciou a busca por ligantes endógenos. Em 1988, um complexo sistema molecular/ biológico foi descoberto pelos pesquisadores Allyn Howlett e W.A. Devane, o qual foi denominado sistema endocanabinoide revisto por (LOWE, TOYANG, *et al.*, 2021). Essa descoberta propiciou a identificação da anandamida (AEA) em 1992 revisto por (MCHUGH, ROSS, 2009). Em 1995, o segundo ligante endógeno foi identificado, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) revisto por (MCHUGH, ROSS, 2009).

Atualmente, já são descritos diversos componentes amplamente distribuídos por tecidos e células em mamíferos, que compõem o sistema endocanabinoide, que incluem receptores, ligantes e enzimas estas últimas envolvidas na biossíntese e degradação em diferentes processos biológicos (MARZO, 2009). O conceito de sistema endocanabinoide foi expandido para sistema endocanabinoma e os receptores descritos como pertencentes a este sistema expandido, três classes se destacam: i) receptores de proteínas acoplados à proteína G (GPCRs), como CB₁R e CB₂R (MUNRO, THOMAS, *et al.*, 1993); ii) receptores nucleares, como PPARs (O'SULLIVAN, 2016, YANG, ZHENG, 2017) e; iii) canais iônicos sensíveis ao ligante, como Receptor Potencial Transitório Vanilóide subtipo 1 (TRPV1). As enzimas metabólicas envolvidas na síntese e degradação dos endocanabinoides, são as isoenzimas α e β da lipase diacilglicerol (DAGL), a hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH), a lipase monoacilglicerol (MAGL) e a fosfolipase D seletiva *para* N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) (DARIŠ, VERBOTEN, *et al.*, 1941, MARZO, BIFULCO, *et al.*, 2004). Os ligantes endógenos descritos até o momento como: AEA e 2-AG permanecem os mesmos descritos pela primeira vez na década de 1990 (revisto em MCHUGH, ROSS, 2009).

Sabe-se que o sistema endocanabinoide é responsável pela manutenção da homeostase, bem como regula diversos processos neurofisiológicos e desenvolvimento pré e pós-natal revisto por (BATTISTA, TOMMASO, *et al.*, 2012, LOWE, TOYANG, *et al.*, 2021). Além dos papéis desempenhados em processos fisiológicos, já é descrito o envolvimento do sistema endocanabinoide na fisiopatologia de diferentes doenças. Por esta razão, o sistema endocanabinoide se tornou alvo terapêutico para uma grande diversidade de condições patológicas considerando a sua distribuição e participação em diferentes vias de sinalização celular (Figura 1.4) (LOWE, TOYANG, *et al.*, 2021). Neste contexto, a ativação dos receptores CB₁R ou CB₂R, seja por canabinóide endógeno ou exógeno, promovem o acoplamento principalmente à proteína G G $\alpha_{i/o}$, bem como o recrutamento de β -arrestina (Figura 1.4) e provocam a ativação ou inibição de transdutores como a inibição da adenilil ciclase (AC) e, consequente, rápida redução dos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e/ou ativação diferentes membros da família de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), incluindo ERK1/ERK2, p38 e JNK1/2 (Figura 4). Além disso, sabe-se que as subunidades G $\beta\gamma$, após dissociação de G $\alpha_{i/o}$, ativam

os canais de potássio retificadores internos controlados pela proteína G (GIRKs) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e inibem os canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC), resultando em múltiplos efeitos revisto por (SOUZA, ROSAS, 2018, WOUTERS, WALRAED, *et al.*, 2019) (Figura 4).

Figura 4: Vias de sinalização mediadas pela ativação de CB₁ e CB₂



Legenda: Vias de sinalização dos CB₁R e CB₂R por canabinoides endógeno ou exógeno. Tem-se uma lacuna de conhecimento para a sinalização do CB₂ através da β-arrestina 1, resultante da falta de estudos aprofundados sobre essa via de sinalização. Abreviaturas- ERK1/2 e ERK5: quinase regulada por sinal extracelular (membros da família da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)), JNK: quinase N-terminal c-Jun, p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38, GIRK: proteína G canais de potássio retificadores internos, PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase e VGCC: canais de cálcio dependentes de voltagem. Fonte: Adaptado de (WOUTERS, WALRAED, *et al.*, 2019)

Devido a seus relevantes papéis fisiológicos e fisiopatológicos, substâncias canabimiméticas como agonistas e antagonistas de receptores canabinoides vem sendo desenvolvidas com o objetivo de modular vias que envolvem a participação dos receptores canabinoides, seja para aumentar ou inibir a sua atividade (LOWE, TOYANG, *et al.*, 2021, MARZO, 2008). Tais substâncias são usadas como

intervenção farmacológica para avaliar o papel desses receptores na atividade de diferentes tipos celulares em diferentes contextos fisiopatológicos.

Canabinoides e sistema imune inato

A ativação dos CB₁R e CB₂R interferem na migração, ativação celular e a produção de citocinas e quimiocinas. A sua ação efetiva imediata sobre a função imunológica acontece em sítios ativos na periferia e no sistema nervoso central (SNC) (CABRAL, FERREIRA, *et al.*, 2015).

Em células específicas do sistema imunológico inato como os macrófagos, os resultados sugerem que o fitocanabinoide, canabidiol (CBD), suprime a produção de NO e os mecanismos envolvidos seriam a inibição da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) mediante a diferentes estímulos inflamatórios (NICHOLS, KAPLAN, 2019). Em neutrófilos, o CBD apresentou diferentes ações dependentes do tecido estudado. Na inflamação pulmonar murina induzida por lipopolissacarídeo (LPS), foi observada a redução de neutrófilos no lavado broncoalveolar após tratamento com CBD em comparação com os animais que não receberam o tratamento (RIBEIRO, A, ALMEIDA, *et al.*, 2015, RIBEIRO, FERRAZ-DE-PAULA, *et al.*, 2012).

Os receptores CB₁ são majoritariamente expressos no SNC modulando processos fisiológicos, como aprendizado, memória, percepção da dor (LOWE, TOYANG, *et al.*, 2021, MCHUGH, ROSS, 2009, SOUZA, ROSAS, 2018). Entretanto, já existem estudos que relatam a sua expressão em diferentes tecidos periféricos. Já tem sido descrito o papel *in vitro* do CB₁R na quimiotaxia de neutrófilos e NETose, via sinalização de EROs e MAPK (ZHOU, YANG, *et al.*, 2020). Além disso, em experimentos *in vivo*, foi observado que o bloqueio de CB₁R reduz a ativação e o infiltrado neutrofílico (ZHOU, YANG, *et al.*, 2020).

Dentre os trabalhos que investigaram o papel do CB₂R foi observado que a deficiência de CB₂R promove o aumento da capacidade invasiva e potencial de ativação de neutrófilos através do aumento da secreção e expressão dos genes Ccl3/Cxcl10 e MMP-9, respectivamente, no baço. Enquanto a ativação do CB₂R impede a liberação de MMP-9 em neutrófilos tanto *in vivo* e como *in vitro* (KAPELLOS, RECIO, *et al.*, 2017, MONTECUCCO, MARZO, *et al.*, 2012). Corroborando com o exposto acima, Liu e colaboradores, demonstraram que a ativação do receptor CB₂

tem um efeito protetor em modelo experimental murino de sepse e *in vitro* (LIU, YUAN, *et al.*, 2020). O tratamento com o agonista específico de CB₂R, HU308, levou ao aumento da sobrevivência e melhora da ALI induzida por CLP (*Cecal Ligation and Puncture*, ligadura e punção cecal) em animais, através do aumento da autofagia. Neste estudo, a autofagia é apresentada como uma importante via de sinalização para o efeito anti-inflamatório de CB₂R (LIU, YUAN, *et al.*, 2020).

Em respostas inflamatórias induzidas por infecções bacterianas, os receptores CB₂ parecem estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos e depuração bacteriana no contexto da sepse (TSCHÖP, KASTEN, *et al.*, 2009). Os receptores CB₂ também parecem modular a reação inflamatória induzida por micobactérias, uma vez que o uso do agonista CB₂, β -cariofileno (BCP), diminuiu o acúmulo e ativação de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios, em modelo experimental de pleurisia induzida pela vacina do *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette-Guérin- BCG) (SILVA, CORREA, *et al.*, 2016).

Deste modo, observa-se que os estudos que investigam a modulação do canabinoides e sistema imune inato, especificamente neutrófilos, sugerem o receptor CB₂ como potencial alvo terapêutico para modulação dessas células em doenças inflamatórias sistêmicas.

Canabinoides e malária

Recentemente, Alferink e colaboradores (2016) investigaram o papel do CB₂R na malária cerebral experimental (ECM) (ALFERINK, SPECHT, *et al.*, 2016). A inibição genética ou farmacológica do CB₂R protege o desenvolvimento de malária cerebral pela infecção por *PbA* aumentando a sobrevida e diminuindo a parasitemia no tecido cerebral em comparação com os camundongos *wild type* (WT) (ALFERINK, SPECHT, *et al.*, 2016). Campos e colaboradores (2015), observaram um aumento da sobrevida e melhora da função comportamental e cognitiva de camundongos tratados com CBD em conjunto com antimalárico no modelo de malária cerebral, sugerindo que o CBD possa ser um candidato promissor a adjuvante a medicamentos antimaláricos para prevenção de danos cerebrais (CAMPOS, BRANT, *et al.*, 2015). Akinola e colaboradores (2018) avaliaram os benefícios e riscos associados à ingestão oral de *Cannabis sativa* em modelo murino de malária induzida por *PbA*. Os autores observaram inibição da sintomatologia da malária, que não estava relacionada à

redução de parasitemia, sugerindo assim um potencial da *Cannabis sativa* para reduzir a patogenicidade da malária em animais. No entanto, existe a possibilidade de potenciais efeitos deletérios do uso contínuo de misturas de cannabis para o tratamento da malária (AKINOLA, OGBECHE, *et al.*, 2018).

Como exposto acima, na literatura são descritos dados controversos sobre os efeitos dos canabinoides e de seus respectivos receptores nos diferentes modelos experimentais inflamatórios. Sendo assim, a investigação da participação dos receptores canabinoides na modulação da resposta inflamatória ainda se faz necessária.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. "Imunologia Celular e Molecular", **Elsevier Editora Ltda.**, v. 27, n. 1, p. 53–54, 2019. DOI: 10.1590/s0036-46651985000100010.
- ABOOD, M., ALEXANDER, S., BARTH, F., *et al.* Cannabinoid receptors in GtoPdb. 2023. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. DOI: doi.org/10.2218/gtopdb/F13/2023.1. Disponível em: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=13>.
- AITKEN, E. H., NEGRI, E. M., BARBOZA, R., *et al.* "Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury / acute respiratory distress syndrome", **Malaria Journal**, v. 13, n. 230. p. 1–10, 2014. DOI: 10.1186/1475-2875-13-230.
- AKGUL, C., MOULDING, D. A., EDWARDS, S. W. "Molecular control of neutrophil apoptosis", **FEBS Letters**, v. 487, n. 3, p. 318–322, 2001. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02324-3.
- AKINOLA, O., OGBECHE, E. O., OLUMOH-ABDUL, H. A., *et al.* "Oral Ingestion of Cannabis sativa : Risks , Benefits , and Effects on Malaria-Infected Hosts", **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, p. 219–227, 2018. DOI: 10.1089/can.2018.0043. .
- ALBRENGUES, J., SHIELDS, M., NG, D., *et al.* "Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice", **Science**, v. 361, n. 6409, 2018. DOI: 10.1126/science.aao4227.Neutrophil. .
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E., KNOWLES, R. G. "Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition", **Biochem. J**, v. 615, p. 593–615, 2001. .
- ALFARO, C., TEIJEIRA, A., OÑATE, C., *et al.* "Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)", **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 15, p. 3924–3936, 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2463. .
- ALFERINK, J., SPECHT, S., ARENDS, H., *et al.* "Cannabinoid receptor 2 modulates susceptibility to experimental cerebral malaria through a CCL17-dependent Mechanism", **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 37, p. 19517–19531, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.746594. .
- AMBROŻEWICZ, E., WÓJCIK, P., WRÓŃSKI, A., *et al.* "Pathophysiological alterations of redox signaling and endocannabinoid system in granulocytes and plasma of psoriatic patients", **Cells**, v. 7, n. 10, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3390/cells7100159. .
- AMPAWONG, S., CHAISRI, U., VIRIYAVEJAKUL, P., *et al.* "A potential role for interleukin - 33 and γ - epithelium sodium channel in the pathogenesis of human malaria associated lung injury", **Malaria Journal**, v. 33, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1186/s12936-015-0922-x. .
- AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., *et al.* "Neutrophil function: From

mechanisms to disease", **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459–489, 2012. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942. .

AN, Z., LI, J., YU, J., *et al.* "Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- κ B signaling in macrophages", **Cell Cycle**, v. 18, n. 21, p. 2928–2938, 2019. DOI: 10.1080/15384101.2019.1662678. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1662678>.

ANDRADE, B. B., REIS-FILHO, A., SOUZA-NETO, S. M., *et al.* "Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance", p. 1–8, 2010. .

ANSTEY, N. M., JACUPS, S. P., CAIN, T., *et al.* "Pulmonary Manifestations of Uncomplicated Falciparum and Vivax Malaria: Cough, Small Airways Obstruction, Impaired Gas Transfer, and Increased Pulmonary Phagocytic Activity", **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 1326–1334, 2002. .

ARRAES, S. M. A., FREITAS, M. S., DA SILVA, S. V., *et al.* "Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation", **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906–2913, 2006. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024638. .

ARRUDA, M. A., ROSSI, A. G., DE FREITAS, M. S., *et al.* "Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF- κ B", **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 2023–2030, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.173.3.2023. .

BATTISTA, N., TOMMASO, M. Di, BARI, M., *et al.* "The endocannabinoid system: an overview", **Frontiers Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. March, p. 1–7, 2012. DOI: 10.3389/fnbeh.2012.00009. .

BEAUVAIS, F., MICHEL, L., DUBERTRET, L. "Exogenous Nitric Oxide Elicits Chemotaxis of Neutrophils In Vitro", **JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY**, v. 614, p. 610–614, 1995. .

BELNOUE, E., POTTER, S. M., ROSA, D. S., *et al.* "Control of pathogenic CD8 + T cell migration to the brain by IFN- γ during experimental cerebral malaria", **Parasite Immunology**, p. 544–553, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01053.x. .

BENNETT, L., PALUCKA, A. K., ARCE, E., *et al.* "Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood", **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 6, p. 711–723, 2003. DOI: 10.1084/jem.20021553. .

BERGHE, T. Vanden, VANLANGENAKKER, N., PARTHOENS, E., *et al.* "Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features", **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 6, p. 922–930, 2010. DOI: 10.1038/cdd.2009.184. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.184>.

BOXIO, R., BOSSENMEYER-POURIE, C., STEINCKWICH, N., *et al.* "Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils Abstract: The mouse has become an important model for immunological studies including innate of our data revealed minor differences between difference was the lifespan of the ",

Journal of Leukocyte Biology, v. 75, n. April, p. 1–8, 2004. DOI: 10.1189/jlb.0703340.1. .

BRASIL, P., ZALIS, M. G., PINA-COSTA, A. De, *et al.* "Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro : a molecular epidemiological investigation", **Lancet Glob Health**, 2017. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9. .

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., *et al.* "Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria", **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004. DOI: 10.1126/science.1092385. .

BRITO, M. A. M., BARO, B., RAIOL, T. C., *et al.* "Morphological and Transcriptional Changes in Human Bone Marrow during Natural Plasmodium vivax Malaria Infections", **Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 7, p. 1274–1283, 2022. DOI: 10.1093/infdis/jiaa177. .

BRUNS, S., KNIEMEYER, O., HASENBERG, M., *et al.* "Production of Extracellular Traps against Aspergillus fumigatus In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by", **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–18, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000873. .

BRYANT, J. J. ., MEHTA, P., VON DER PORTEN, A., *et al.* "CO-PURIFICATION OF 130 KD NITRIC OXIDE SYNTHASE AND A 22 KD LINK PROTEIN FROM HUMAN NEUTROPHILS", **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, v. 189, n. 30, p. 558–564, 1992. .

CABRAL, G. A., FERREIRA, G. A., JAMERSON, M. J. "Endocannabinoids and the Immune System in Health and Disease", 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-20825-1. .

CAMPOS, A. C. De, BRANT, F., MIRANDA, A. S., *et al.* "Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of Cerebral Malaria", **NEUROSCIENCE**, 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.051. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.051>.

CAPUCETTI, A., ALBANO, F., BONECCHI, R. "Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology", **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. July, p. 1–9, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01259. .

CARMONA-RIVERA, C., ZHAO, W., YALAVARTHI, S., *et al.* "Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2", **Ann Rheum Dis.**, v. 74, n. 7, p. 1417–1424, 2016. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204837.Neutrophil. .

CARNEVALE, S., CEGLIE, I. Di, GRIECO, G., *et al.* "Neutrophil diversity in inflammation and cancer", **Frontiers in Immunology**, n. April, p. 14–26, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1180810. .

CASCÃO, R., ROSÁRIO, H. S., SOUTO-CARNEIRO, M. M., *et al.* "Autoimmunity Reviews Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors", **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 8, p. 531–535, 2010. DOI:

10.1016/j.autrev.2009.12.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.013>.

CASSATELLA, M. A., ÖSTBERG, N. K., TAMASSIA, N., *et al.* "Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines", **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 648–664, 2019. DOI: 10.1016/j.it.2019.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.003>.

CASTANHEIRA, F. V. S., KUBES, P. "Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation", **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178–2185, 2019. DOI: 10.1182/blood-2018-11-844530. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>.

CHAN, L., KARIMI, N., MOROVATI, S., *et al.* "The Roles of Neutrophils in Cytokine Storms", **viruses**, p. 1–20, 2021. .

CHAPMAN, E. A., LYON, M., SIMPSON, D., *et al.* "Caught in a Trap ? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus", **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. March, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00423. .

CHEN, T., LI, Y., SUN, R., *et al.* "Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils", **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. November, p. 1–10, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.775267. .

CHINTAKUNTLAWAR, A. V., CHODOSH, J. "Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis", **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 10, p. 657–666, 2009. DOI: 10.1089/jir.2009.0006. .

CHOUINARD, F., LEFEBVRE, J. S., NAVARRO, P., *et al.* "The Endocannabinoid 2-Arachidonoyl-Glycerol Activates Human Neutrophils: Critical Role of Its Hydrolysis and De Novo Leukotriene B 4 Biosynthesis", **The Journal of Immunology**, p. 10, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1002853. .

CHRISTOFFERSSON, G., VÅGESJÖ, E., VANDOOREN, J., *et al.* "VEGF-Recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue", **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4653–4662, 2012. DOI: 10.1182/blood-2012-04-421040. .

CLARK, I. A., BUDD, A. C., ALLEVA, L. M., *et al.* "Human malarial disease: A consequence of inflammatory cytokine release", **Malaria Journal**, v. 5, p. 1–32, 2006. DOI: 10.1186/1475-2875-5-85. .

COLGAN, S. P., COMERFORD, K. M., LAWRENCE, D. W. "Epithelial cell-neutrophil interactions in the alimentary tract: a complex dialog in mucosal surveillance and inflammation.", **TheScientificWorldJournal**, v. 2, p. 76–88, 2002. DOI: 10.1100/tsw.2002.77. .

COLOTTA, F., RE, F., POLENTARUTTI, N., *et al.* "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products", **Blood**, v. 80, n. 8, p. 2012–2020, 1992. DOI: 10.1182/blood.v80.8.2012.bloodjournal8082012. .

COSTA, F. T. M., LOPES, S. C. P., ALBRECHT, L., *et al.* "On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian field", **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099–1105, 2012. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.007>.

DALBONI, T. M., ABE, A. E., DE OLIVEIRA, C. E., *et al.* "Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging", **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 716–719, 2013. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.01.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.01.016>.

DARIŠ, B., VERBOTEN, M. T., KNEZ, Ž., *et al.* "Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation", **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, p. 14–23, 1941. .

DAS, S. T., RAJAGOPALAN, L., GUERRERO-PLATA, A., *et al.* "Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment", **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0011754. .

DE AZEVEDO-QUINTANILHA, I. G., VIEIRA-DE-ABREU, A., FERREIRA, A. C., *et al.* "Integrin $\alpha\beta 2$ (CD11d/CD18) mediates experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome (MA-ARDS)", **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1186/s12936-016-1447-7. .

DE FRUTOS, T., SÁNCHEZ DE MIGUEL, L., FARRÉ, J., *et al.* "Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: Modification by tumor necrosis factor- α and during acute myocardial infarction", **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 3, p. 800–807, 2001. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)01185-2. .

DELGADO, J. G., TY, M., ORENGO, J. M., *et al.* "A Surprising Role for Uric Acid: The Inflammatory Malaria Response", **Curr Rheumatol Rep.**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1007/s11926-013-0401-8.A. .

DENISET, J. F., SUREWAARD, B. G., LEE, W. Y., *et al.* "Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*", **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 5, p. 1333–1350, 2017. DOI: 10.1084/jem.20161621. .

DENNY, M. F., YALAVARTHI, S., ZHAO, W., *et al.* "A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs", **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 6, p. 3284–3297, 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199. .

DEROOST, K., PHAM, T., OPDENAKKER, G., *et al.* "The immunological balance between host and parasite in malaria", **Journal Investing in science**, n. November, p. 1–50, 2015. DOI: 10.1093/femsre/fuv046. .

DEROOST, K., TYBERGHEIN, A., LAYS, N., *et al.* "Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome", **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 48, n.

5, p. 589–600, 2013. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0450OC. .

DUMARCHEY, A., LAVAZEC, C., VERDIER, F. "Erythropoiesis and Malaria, a Multifaceted Interplay", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, 2022. DOI: 10.3390/ijms232112762. .

DUNST, J., KAMENA, F., MATUSCHEWSKI, K. "Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00324. .

EASH, K. J., GREENBAUM, A. M., GOPALAN, P. K., *et al.* "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow", **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 7, p. 2423–2431, 2010. DOI: 10.1172/JCI41649. .

EPIPHANIO, S., CAMPOS, M. G., PAMPLONA, A., *et al.* "VEGF Promotes Malaria-Associated Acute Lung Injury in Mice", **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000916. .

EVANS, T. J., BUTTERY, L. D. K., CARPENTER, A., *et al.* "Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9553–9558, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9553. .

FESTJENS, N., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P. "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response", **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9–10, p. 1371–1387, 2006. DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.06.014. .

FORTIN, A., STEVENSON, M. M., GROS, P. "Susceptibility to malaria as a complex trait: Big pressure from a tiny creature", **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2469–2478, 2002. DOI: 10.1093/hmg/11.20.2469. .

FRAGA-SILVA, R. A., COSTA-FRAGA, F. P., MONTECUCCO, F., *et al.* "Treatment with CB2 agonist JWH-133 reduces histological features associated with erectile dysfunction in hypercholesterolemic mice", **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/263846. .

FUCHS, T. A., BRILL, A., DUERSCHMIED, D., *et al.* "Extracellular DNA traps promote thrombosis", **PNAS**, v. 107, n. 36, p. 15880–15885, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1005743107/-
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005743107. .

GAZZINELLI, R. T., KALANTARI, P., FITZGERALD, K. A., *et al.* "Innate sensing of malaria parasites", **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 2014. DOI: 10.1038/nri3742. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3742>.

GIERLIKOWSKA, B., STACHURA, A., GIERLIKOWSKI, W. "The Impact of Cytokines on Neutrophils ' Phagocytosis and NET Formation during Sepsis — A Review", **Internacional Journal of Molecular Sciences**, 2022. .

GOLDMANN, O., MEDINA, E. "The expanding world of extracellular traps : not only

neutrophils but much more", **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. January, p. 1–10, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00420. .

GOLSTEIN, P., KROEMER, G. "Cell death by necrosis: towards a molecular definition", **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, 2006. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.11.001. .

GÓMEZ, C. T., LAIRION, F., REPETTO, M., *et al.* "Cannabidiol (CBD) Alters the Functionality of Neutrophils (PMN). Implications in the Refractory Epilepsy Treatment", **pharmaceuticals MDPI**, p. 1–12, 2021. .

GOWDA, D. C. "TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs", **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 596–604, 2007. DOI: 10.1016/j.pt.2007.09.003. .

GRAHAM, E. S., ANGEL, C. E., SCHWARCZ, L. E., *et al.* "Detailed characterisation of CB2 receptor protein expression in peripheral blood immune cells from healthy human volunteers using flow cytometry", **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 25–34, 2010. DOI: 10.1177/039463201002300103. .

GROSSO, A. F. "Cannabis : de planta condenada pelo preconceito a uma das grandes opções terapêuticas do século", **Journal of Human Growth and Development**, v. 30, n. 1, p. 94–97, 2020. .

GUPTA, A. K., JOSHI, M. B., PHILIPPOVA, M., *et al.* "Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death", **FEBS Letters**, v. 584, n. 14, p. 3193–3197, 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.06.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.006>.

HALL, N., KARRAS, M., RAINE, J. D., *et al.* "A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses", **Science**, v. 307, n. 5706, p. 82–86, 2005. DOI: 10.1126/science.1103717. .

HAO, M. X., JIANG, L. S., FANG, N. Y., *et al.* "The cannabinoid WIN55,212-2 protects against oxidized LDL-induced inflammatory response in murine macrophages", **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 8, p. 2181–2190, 2010. DOI: 10.1194/jlr.M001511. .

HASLETT, C., SAVILL, J. S., WHYTE, M. K. B., *et al.* "Granulocyte Apoptosis and the Control of Inflammation", **Philosophical Transactions of The Royal Society**, p. 327–333, 1994. DOI: 10.1098/rstb.1994.0113. .

HIDALGO, A., CHILVERS, E. R., SUMMERS, C., *et al.* "The Neutrophil Life Cycle", **Trends in Immunology**, v. 40, n. 7, p. 584–597, 2019. DOI: 10.1016/j.it.2019.04.013. .

HOPPENBROUWERS, T., AUTAR, A. S. A., SULTAN, A. R., *et al.* "In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review", **plos one**, p. 1–29, 2017. .

HYTTI, M., ANDJELIC, S., JOSIFOVSKA, N., *et al.* "CB2 receptor activation causes an ERK1/2-dependent inflammatory response in human RPE cells", **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16524-w. .

IGLESIAS, P. A., DEVREOTES, P. N. "Navigating through models of chemotaxis", **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 35–40, 2008. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.11.011. .

JAIN, A., KAUSHIK, R., KAUSHIK, R. M. **Malarial hepatopathy: Clinical profile and association with other malarial complications.** [S.l.], Elsevier B.V., 2016. v. 159. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.031>. .

JIANG, L., CHEN, Y., HUANG, X., *et al.* "Selective activation of CB2 receptor improves efferocytosis in cultured macrophages", **Life Sciences**, v. 161, p. 10–18, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.07.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.013>. .

JR MILNER, D. A. "Malaria Pathogenesis", p. 12, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a025569. .

KAMBAS, K., MITROULIS, I., RITIS, K. "The emerging role of neutrophils in thrombosis — the journey of TF through NETs", **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. December, p. 1–8, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00385. .

KAPELLOS, T. S., RECIO, C., GREAVES, D. R., *et al.* "Cannabinoid Receptor 2 Modulates Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Endotoxemia", **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/4315412. .

KAPELLOS, T. S., TAYLOR, L., FEUERBORN, A., *et al.* "Cannabinoid receptor 2 deficiency exacerbates inflammation and neutrophil recruitment", **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 33, n. 5, p. 6154–6167, 2019. DOI: 10.1096/fj.201802524R. .

KESHARI, R. S., JYOTI, A., DUBEY, M., *et al.* "Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition", **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0048111. .

KETTRITZ, R., GAIDO, M. L., HALLER, H., *et al.* "Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils", **Kidney International**, v. 53, n. 1, p. 84–91, 1998. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00741.x. .

KHO, S., MINIGO, G., ANDRIES, B., *et al.* "Circulating Neutrophil Extracellular Traps and Neutrophil Activation Are Increased in Proportion to Disease Severity in Human Malaria", **The Journal of Infectious Diseases**, v. 219, p. 1994–2004, 2019. DOI: 10.1093/infdis/jiy661. .

KICMAN, A., PĘDZIŃSKA-BETIUK, A., KOZŁOWSKA, H. "The potential of cannabinoids and inhibitors of endocannabinoid degradation in respiratory diseases", **European Journal of Pharmacology**, v. 911, 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174560. .

KNOWLES, R. G., MONCADA, S. "Nitric oxide synthases in mammals", **Biochem. J**,

v. 258, p. 249–258, 1994. .

KOLACZKOWSKA, E., KUBES, P. "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation", **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. DOI: 10.1038/nri3399. .

KOVACH, M. A., STANDIFORD, T. J. "The function of neutrophils in sepsis", **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 321–327, 2012. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3283528c9b. .

KRAUS, R. F., GRUBER, M. A. "Neutrophils—From Bone Marrow to First-Line Defense of the Innate Immune System", **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. December, p. 1–35, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.767175. .

KRÉMER, V., GODON, O., BRUHNS, P., *et al.* "Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation", **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. November, p. 1–12, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1301183. .

KRYSKO, D. V., VANDEN BERGHE, T., D'HERDE, K., *et al.* "Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis", **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205–221, 2008. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001. .

KUBES, P. "The enigmatic neutrophil: what we do not know", **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 399–406, 2018. DOI: 10.1007/s00441-018-2790-5. .

LACERDA, M. V., MOURÃO, M. P., ALEXANDRE, M. A., *et al.* "Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: A systematic review on the contributions of the Brazilian literature", **Malaria Journal**, v. 11, p. 1–18, 2012. DOI: 10.1186/1475-2875-11-12. .

LALREMRUATA, A., MAGRIS, M., VIVAS-MARTÍNEZ, S., *et al.* "EBioMedicine Natural infection of Plasmodium brasilianum in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon", **EBIOM**, v. 2, n. 9, p. 1186–1192, 2015. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033>.

LI, M., CARPIO, D. F., ZHENG, Y., *et al.* "An Essential Role of the NF- κ B / Toll-Like Receptor Pathway in Induction of Inflammatory and Tissue-Repair Gene Expression by Necrotic Cells ", **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7128–7135, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.166.12.7128. .

LI, T., PENG, R., WANG, F., *et al.* "Lysophosphatidic acid promotes thrombus stability by inducing rapid formation of neutrophil extracellular traps: A new mechanism of thrombosis", **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 8, p. 1952–1964, 2020. DOI: 10.1111/jth.14839. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jth.14839>.

LI, T., ZHANG, Z., LI, X., *et al.* "Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance", **Hindawi Mediators of Inflammation**, 2020. .

LIEW, J. W. K., BUKHARI, F. D. M. "Natural Plasmodium inui Infections in Humans and Anopheles", **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 10, 2021. .

LIEW, P. X., KUBES, P. "The Neutrophil's role during health and disease", **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 2019. DOI: 10.1152/physrev.00012.2018. .

LIU, A. P., YUAN, Q. H., ZHANG, B., *et al.* "Cannabinoid receptor 2 activation alleviates septic lung injury by promoting autophagy via inhibition of inflammatory mediator release", **Cellular Signalling**, v. 69, n. November 2019, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109556. .

LOOD, C., BLANCO, L. P., PURMALEK, M. M., *et al.* "Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease", **Nat Med.**, v. 22, n. 2, p. 146–153, 2016. DOI: 10.1038/nm.4027. Neutrophil. .

LÓPEZ-DYCK, E., ANDRADE-URZÚA, F., ELIZALDE, A., *et al.* "ACPA and JWH-133 modulate the vascular tone of superior mesenteric arteries through cannabinoid receptors, BKCa channels, and nitric oxide dependent mechanisms", **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 6, p. 1131–1139, 2017. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.06.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2017.06.011>.

LOWE, H., TOYANG, N., STEELE, B., *et al.* "The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases", **Internacional Journal of Molecular Sciences**, 2021. .

MACPHERSON, G. . "A Quantitative Ultrastructural Analysis of Parasitized", 1985. .

MAGUIRE, G. P., HANDOJO, T., PAIN, M. C. F., *et al.* "Lung Injury in Uncomplicated and Severe Falciparum Malaria: A Longitudinal Study in Papua, Indonesia", **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 11, p. 1966–1974, 2005. DOI: 10.1086/497697. Lung. .

MAHANTA, A., KAR, S. K., KAKATI, S., *et al.* "Heightened inflammation in severe malaria is associated with decreased IL-10 expression levels and neutrophils", **Innate Immunity**, p. 7, 2015. DOI: 10.1177/1753425914561277. .

MAIANSKI, N. A., MAIANSKI, A. N., KUIJPERS, T. W., *et al.* "Apoptosis of Neutrophils", **Acta Haematologica**, p. 56–66, 2004. DOI: 10.1159/000074486. .

MANTOVANI, A., CASSATELLA, M. A., COSTANTINI, C. "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity", **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011. DOI: 10.1038/nri3024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3024>.

MARZO, V. Di. "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?", **Nature Publishing Group**, v. 7, n. may, 2008. DOI: 10.1038/nrd2553. .

MARZO, V. Di. "The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation", **Pharmacological Research**, v. 60, p. 77–84, 2009. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.02.010. .

MARZO, V. Di, BIFULCO, M., PETROCELLIS, L. De, *et al.* "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation", **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. September, 2004. DOI: 10.1038/nrd1495. .

MCCRACKEN, J. M., ALLEN, L. A. H. "Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease", **Journal of Cell Death**, v. 7, n. 1, p. 15–23, 2014. DOI: 10.4137/JCD.S11038. .

MCHUGH, D., ROSS, R. A. "Endogenous Cannabinoids and Neutrophil Chemotaxis", v. 81, n. 09, p. 337–365, 2009. DOI: 10.1016/S0083-6729(09)81013-3. .

MILNER, D. A., VALIM, C., CARR, R. A., *et al.* "A histological method for quantifying Plasmodium falciparum in the brain in fatal paediatric cerebral malaria", **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1475-2875-12-191. Disponível em: Malaria Journal.

MILNER, D. A., WHITTEN, R. O., KAMIZA, S., *et al.* "The systemic pathology of cerebral malaria in African children", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. AUG, p. 1–13, 2014. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00104. .

MONTECUCCO, F., LENGLET, S., BRAUNERSREUTHER, V., *et al.* "CB2 cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion", **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 5, p. 612–620, 2009. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.014>.

MONTECUCCO, F., MARZO, V. Di, SILVA, R. F., *et al.* "The activation of the cannabinoid receptor type 2 reduces neutrophilic protease-mediated vulnerability in atherosclerotic plaques", **European society of cardiology**, p. 846–856, 2012. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr449. .

MUKAIDA, N. "Pathophysiological roles of interleukin-8 / CXCL8 in pulmonary diseases", **Am J Phusiol Lung Cell Mol Physiol**, p. 566–577, 2003. .

MÜLLER, S., BEHNEN, M., BIEBER, K., *et al.* "Dimethylfumarate impairs neutrophil functions", **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p. 117–126, 2016. DOI: 10.1038/JID.2015.361. .

MUNRO, S., THOMAS, K. L., ABU-SHAAR, M. "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids", **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993. DOI: 10.1038/365061a0. .

MURIKINATI, S., JU, E., KEINERT, T., *et al.* "Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment", **The FASEB Journal**, n. 1, p. 11, 2010. DOI: 10.1096/fj.09-141275. .

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M., *et al.* **Imunobiologia de Janeway**. [S.l.: s.n.], 2010.

NAGRE, N., NICHOLSON, G., CONG, X., *et al.* "Activation of cannabinoid-2 receptor protects against Pseudomonas aeruginosa induced acute lung injury and

inflammation", **Respiratory Research**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1186/s12931-022-02253-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02253-w>.

NATHAN, C. "Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities", **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006. DOI: 10.1038/nri1785. .

NGUEE, S. Y. ., BARBOZA, W. D. J., EPIPHANIO, S., *et al.* "Experimental Models to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–23, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.899581. .

NICHOLS, J. M., KAPLAN, B. L. F. "Immune Responses Regulated by Cannabidiol", **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. X, n. X, p. 7–16, 2019. DOI: 10.1089/can.2018.0073. .

NILSSON, O., FOWLER, C. J., JACOBSSON, S. O. P. "The cannabinoid agonist WIN 55 , 212-2 inhibits TNF- α -induced neutrophil transmigration across ECV304 cells", **European Journal of Pharmacology**, v. 547, p. 165–173, 2006. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.07.016. .

NOLAN, S., DIXON, R., NORMAN, K., *et al.* "Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation", **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 265–273, 2008. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070069. .

O'SULLIVAN, S. E. "An update on PPAR activation by cannabinoids", **British Journal of Pharmacology**, v. 16, 2016. DOI: 10.1111/bph.13497. .

OLIVEIRA, H. D. de. "Ácido Acetilsalicílico E Terapia Combinada Com Dihidroartemisinina Na Síndrome Do Desconforto Respiratório Agudo Associado À Malária: Análise Da Função Pulmonar E Do Processo Inflamatório", p. 141, 2019. Disponível em: https://acervos.icict.fiocruz.br/man/doutorado_bibmang/helena_oliveira_ioc_dout_2019.pdf.

OLLIARO, P. "Mortality Associated with Severe Plasmodium falciparum Malaria Increases with Age", **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 158–160, 2008. DOI: 10.1086/589288. .

ORGANIZATION, W. H. **World malaria report**. [S.l: s.n.], 2023.

ORTOLAN, L. S., SERCUNDES, M. K., BARBOZA, R., *et al.* "Predictive Criteria to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated ALI / ARDS in Mice", v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/872464. .

PÁDUA, T. A. **Papel do eixo FPR2/ALXR-lipoxina A4 durante o desenvolvimento da malária grave experimental**. 2016. 193 f. INSTITUTO OSWALDO CRUZ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

PÁDUA, T. A., TORRES, N. D., P CANDÉA, A. L., *et al.* "Therapeutic effect of Lipoxin A 4 in malaria-induced acute lung injury", **Jornal of Leukocyte Biology**, 2018. DOI:

10.1002/JLB.3A1016-435RRR. .

PAN, S. D., GRANDGIRARD, D., LEIB, S. L. "Adjuvant Cannabinoid Receptor Type 2 Agonist Modulates the Polarization of Microglia Towards a Non-Inflammatory Phenotype in Experimental Pneumococcal Meningitis", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.588195. .

PAPAYANNOPOULOS, V., METZLER, K. D., HAKKIM, A., *et al.* "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps", **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010. DOI: 10.1083/jcb.201006052. .

PERCÁRIO, S., MOREIRA, D. R., GOMES, B. A. Q., *et al.* "Oxidative Stress in Malaria", **Internacional Journal of Molecular Sciences**, p. 16346–16372, 2012. DOI: 10.3390/ijms131216346. .

PÉREZ-FIGUEROA, E., ÁLVAREZ-CARRASCO, P., ORTEGA, E. "Neutrophils : Many Ways to Die", **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–19, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.631821. .

PETRETTO, A., BRUSCHI, M., PRATESI, F., *et al.* "Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli : A comparative proteomic analysis", **plos one**, p. 1–18, 2019. .

PETRI, B., SANZ, M. J. "Neutrophil chemotaxis", **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 425–436, 2018. DOI: 10.1007/s00441-017-2776-8. .

PILSCZEK, F. H., SALINA, D., POON, K. K. H., *et al.* "A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus", **The Journal of Immunology**, 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675. .

PINEGIN, B., VOROBJEVA, N., PINEGIN, V. "Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity", **Autoimmunity Reviews**, 2015. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.03.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.03.002>. .

PIRES, R. H., FELIX, S. B., DELCEA, M. "The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy", **Royal Society of Chemistry**, 2016. DOI: 10.1039/c6nr03416k. .

PLUIJM, R. W. Van Der, AMARATUNGA, C., DHORDA, M., *et al.* "Trends in Triple Artemisinin-Based Combination Therapies for Malaria – A New Paradigm ?", **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 15–24, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2020.09.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.011>. .

POLLENUS, E., GOUWY, M., STEEN, P. E. Van Den. "Neutrophils in malaria : The good , the bad or the ugly ?", **Parasite Immunology - John Wiley**, 2022. DOI: 10.1111/pim.12912. .

PRICE, R. N., TJITRA, E., GUERRA, C. A., *et al.* "Vivax malaria : neglected and not

benign", **Am J Trop Med Hyg.**, v. 77, n. 61, p. 79–87, 2007. .

PUNZO, F., MANZO, I., TORTORA, C., *et al.* "Effects of CB2 and TRPV1 receptors ' stimulation in pediatric acute T-lymphoblastic leukemia", **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21244–21258, 2018. .

RAJARATHNAM, K., SCHNOOR, M., RICHARDSON, R. M., *et al.* "How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways", **Cell Signal**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2019. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.11.004.How. .

RIBEIRO, A, ALMEIDA, V. I., PINHEIRO, M. L., *et al.* "Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury", **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 3973, n. 1, p. 35–41, 2015. DOI: 10.3109/08923973.2014.976794. .

RIBEIRO, Alison, FERRAZ-DE-PAULA, V., PINHEIRO, M. L., *et al.* "Cannabidiol , a non-psychoactive plant-derived cannabinoid , decreases inflammation in a murine model of acute lung injury : Role for the adenosine A 2A receptor", **European Journal of Pharmacology**, v. 678, n. 1–3, p. 78–85, 2012. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.12.043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.043>.

RODRIGUES, D. A. S., PRESTES, E. B., GAMA, A. M. S., SILVA, L. de S., PINHEIRO, S., RIBEIRO, J. M. C., CAMPOS, R. M. P., ID, S. S., *et al.* "CXCR4 and MIF are required for neutrophil extracellular trap release triggered by Plasmodium -infected erythrocytes", **PLoS Pathogens**, p. 1–23, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008230. .

RODRIGUES, D. A. S., PRESTES, E. B., GAMA, A. M. S., SILVA, L. de S., PINHEIRO, A. A. S., RIBEIRO, J. M. C., CAMPOS, R. M. P., COELHO, P. M. P., *et al.* "CXCR4 and MIF are required for neutrophil extracellular trap release triggered by Plasmodium -infected erythrocytes", **PLoS Pathogens**, p. 1–23, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008230. .

SATCHWELL, T. J. "Generation of red blood cells from stem cells: Achievements, opportunities and perspectives for malaria research", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. November, p. 1–10, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1039520. .

SAVIL, J. S., WYLLIE, A. H., HENSON, J. E., *et al.* "Macrophage Phagocytosis of Aging Neutrophils in Inflammation Programmed cell Death in the Neutrophils Leads to its Recognition by Macrophages", **The American Society for Clinical Investigation**, p. 865–875, 1989. .

SCACCABAROZZI, D., DEROOST, K., CORBETT, Y., *et al.* "Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with Plasmodium chabaudi AS or Plasmodium berghei NK65", **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1186/s12936-017-2159-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2159-3>.

SECCO, D. D., PARON, A., OLIVEIRA, S. H. P. De, *et al.* "Neutrophil migration in inflammation : nitric oxide inhibits rolling , adhesion and induces apoptosis", **Nitric oxide - Biology and Chemistry**, v. 9, p. 153–164, 2004. DOI:

10.1016/j.niox.2003.11.001. .

SERCUNDES, M. K., ORTOLAN, L. S., DEBONE, D., *et al.* "Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice", **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 1–24, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006054. .

SILVA, M. A.-, CORREA, L. B., CANDE, A. L. P., *et al.* "The cannabinoid 2 receptor agonist b -caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by Mycobacterium bovis BCG by inhibiting neutrophil migration", **Inflammation Research**, p. 11, 2016. DOI: 10.1007/s00011-016-0969-3. .

SINGH, B., SUNG, L. K., MATUSOP, A., *et al.* "A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings", **The Lancet**, v. 363, p. 1017–1024, 2004. .

SMALL-HOWARD, A. L., SHIMODA, L. M. N., ADRA, C. N., *et al.* "Anti-inflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells", **Biochemical Journal**, v. 388, n. 2, p. 465–473, 2005. DOI: 10.1042/BJ20041682. .

SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. "Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation", **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010. DOI: 10.1038/nri2779. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2779>.

SOUZA, Mariana C., PAIXÃO, F. H. M., FERRARIS, F. K., *et al.* "Artesunate exerts a direct effect on endothelial cell activation and NF-κB translocation in a mechanism independent of plasmodium killing", **Malaria Research and Treatment**, v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/679090. .

SOUZA, Mariana C, SILVA, J. D., PÁDUA, T. A., *et al.* "Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria", **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 186, p. 65–72, 2013. DOI: 10.1016/j.resp.2012.12.008. .

SOUZA, Mariana Conceição, ROSAS, E. C., "Cannabinoid Receptors as Regulators of Neutrophil Activity in Inflammatory Diseases". **Intech**, [S.l: s.n.], 2018. p. 13. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

STEEN, P. E. Van Den, GEURTS, N., DEROOST, K., *et al.* "Immunopathology and Dexamethasone Therapy in a New Model for Malaria-associated Acute Respiratory Distress Syndrome", **Am J Respir Crit Care Med**, v. 181, n. 15, p. 12, 2010. DOI: 10.1164/rccm.200905-0786OC. .

STILLIE, R., FAROOQ, S. M., GORDON, J. R., *et al.* "The functional significance behind expressing two IL–8 receptor types on PMN", **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 3, p. 529–543, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0208125. .

TA, T. H., HISAM, S., LANZA, M., *et al.* "First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi", **Malaria Journal**, p. 1–7, 2014. DOI:

10.1186/1475-2875-13-68. .

TAKEI, H., ARAKI, A., WATANABE, H., *et al.* "Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis", **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 2, p. 229–240, 1996. DOI: 10.1002/jlb.59.2.229. .

TAMASSIA, N., BIANCHETTO-AGUILERA, F., ARRUDA-SILVA, F., *et al.* "Cytokine production by human neutrophils : revisiting the “ dark side of the”, **European Journal of Clinical Investigation**, p. 0–1, 2018. DOI: 10.1111/eci.12952. .

TAYLOR, W. R.J., WHITE, N. J. "Malaria and the lung", **Clinics in Chest Medicine**, v. 23, n. 2, p. 457–468, 2002. DOI: 10.1016/S0272-5231(02)00004-7. .

TAYLOR, Walter R J, HANSON, J., TURNER, G. D. H. "Respiratory Manifestations of Malaria", 2012. DOI: 10.1378/chest.11-2655. .

THIAM, H. R., WONG, S. L., WAGNER, D. D., *et al.* "Cellular Mechanisms of NETosis", **Annu Rev Cell Dev Biol.**, p. 191–218, 2021. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016.Cellular. .

THOMAS, G. M., CARBO, C., CURTIS, B. R., *et al.* "Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice", **blood**, p. 6335–6343, 2012. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405183. .

TOTANI, L., AMORE, C., DI SANTO, A., *et al.* "Roflumilast inhibits leukocyte-platelet interactions and prevents the prothrombotic functions of polymorphonuclear leukocytes and monocytes", **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 1, p. 191–204, 2016. DOI: 10.1111/jth.13173. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jth.13173>. .

TSAI, C, LI, K., HSIEH, S., *et al.* "What ' s wrong with neutrophils in lupus", **Clinical and Exeperimental Rheumatology**, 2019. .

TSAI, Chang-youh, HSIEH, S., LIU, C., *et al.* "Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils , Immune , and Non-Immune Cells via Released Cytokines , Granule Proteins , Microvesicles , and Neutrophil Extracellular Trap Formation : A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils", **Internacional Journal of Molecular Sciences**, p. 1–27, 2021. .

TSCHÖP, J., KASTEN, K. R., NOGUEIRAS, R., *et al.* "The Cannabinoid Receptor 2 Is Critical for the Host Response to Sepsis", **The Journal of Immunology**, p. 10, 2009. DOI: 10.4049/jimmunol.0900203. .

TSUKAHARA, Y., MORISAKI, T., KOJIMA, M., *et al.* "iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis", **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 71, n. 1, p. 15–20, 2001. DOI: 10.1046/j.1440-1622.2001.02025.x. .

URBAN, C. F., ERMERT, D., SCHMID, M., *et al.* "Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin , a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*", **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009. DOI:

10.1371/journal.ppat.1000639. .

URBAN, C. F., REICHARD, U., BRINKMANN, V., *et al.* "Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms", **Cellular microbiology**, v. 8, p. 668–676, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x. .

VAN DEN STEEN, P. E., DEROOST, K., DECKERS, J., *et al.* "Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome", **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 346–358, 2013. DOI: 10.1016/j.pt.2013.04.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.006>.

VASQUEZ, M., ZUNIGA, M., RODRIGUEZ, A. "Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria", **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. November, p. 1–8, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.768182. .

VOROBJEVA, N. V., CHERNYAK, B. V. "NETosis : Molecular Mechanisms ,Role in Physiology and Pathology", **Russian in Biokhimiya**, v. 85, n. 10, p. 1178–1190, 2020. .

VOROBJEVA, N. V., PINEGIN, B. V. "Neutrophil Extracellular Traps : Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease", **Biochemistry**, v. 79, n. 12, p. 1286–1296, 2014a. .

VOROBJEVA, N. V., PINEGIN, B. V. "Neutrophil Extracellular Traps : Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease", **Biokhimiya**, v. 79, n. 12, p. 1286–1296, 2014b. .

WANG, Y., LI, M., STADLER, S., *et al.* "Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation", **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200806072. .

WANIKIAT, P., WOODWARD, D. F., ARMSTRONG, R. A. "Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils", **British Journal of Pharmacology**, 1997. .

WÓJCIK, P., BIERNACKI, M., WRÓŃSKI, A., *et al.* "Altered lipid metabolism in blood mononuclear cells of psoriatic patients indicates differential changes in psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, 2019. DOI: 10.3390/ijms20174249. .

WÓJCIK, P., GARLEY, M., WRÓŃSKI, A., *et al.* "Cannabidiol modifies the formation of NETs in neutrophils of psoriatic patients", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186795. .

WÓJCIK, P., GEGOTEK, A., ZARKOVIC, N., *et al.* "Oxidative Stress and Lipid Mediators Modulate Immune Cell Functions in Autoimmune Diseases", **Internacional Journal of Molecular Sciences**, 2021. .

WÓJCIK, P., GEGOTEK, A., ŽARKOVIĆ, N., *et al.* "Oxidative stress and lipid mediators modulate immune cell functions in autoimmune diseases", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–20, 2021. DOI:

10.3390/ijms22020723. .

WOUTERS, E., WALRAED, J., BANISTER, S. D., *et al.* "Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: synthetic cannabinoid receptor agonists", **Biochemical Pharmacology**, v. 169, n. June, p. 113623, 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.08.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.025>.

YANG, F., ZHENG, J. "Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin", **Protein & Cell**, v. 8, n. 3, p. 169–177, 2017. DOI: 10.1007/s13238-016-0353-7. .

YIPP, B. G., PETRI, B., SALINA, D., *et al.* "Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo", **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 10, 2012. DOI: 10.1038/nm.2847. .

YOUSEFI, S., MIHALACHE, C., KOZLOWSKI, E., *et al.* "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps", **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009. DOI: 10.1038/cdd.2009.96. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.96>.

ZARBOCK, A., BISHOP, J., MÜLLER, H., *et al.* "Chemokine homeostasis vs. chemokine presentation during severe acute lung injury: The other side of the Duffy antigen receptor for chemokines", **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 3, p. 462–471, 2010. DOI: 10.1152/ajplung.00224.2009. .

ZHOU, X., YANG, L., FAN, X., *et al.* "Neutrophil Chemotaxis and NETosis in Murine Chronic Liver Injury via Cannabinoid Receptor 1 / G α i / o / ROS / p38 MAPK Signaling Pathway", **cells**, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3390/cells9020373. .