

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, livre ou lipossomal,  
imunomodula funções efetoras de neutrófilos periféricos isolados de  
pacientes com artrite reumatoide e estimulados via receptores  
Fc *gama* e CR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de mestre em ciências.

**Área de concentração:** Imunologia Básica e Aplicada

**Aluna:** Lucinéia Reuse Albiero

**Orientadora:** Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto  
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Albiero, Lucinéia Reuse

6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, livre ou lipossomal, imunomodula funções efetoras de neutrófilos periféricos isolados de pacientes com artrite reumatoide e estimulados via receptores Fc *gamma* e CR. Ribeirão Preto, 2017.

122 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

ALBIERO, L. R. **6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, livre ou lipossomal, imunomodula funções efetoras de neutrófilos periféricos isolados de pacientes com artrite reumatoide e estimulados via receptores Fc *gama* e CR.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## ***DEDICATÓRIA***

*Dedico este trabalho, às pessoas que protagonizaram todo o tempo de execução deste trabalho. A participação intensa de vocês sobre tudo o que aconteceu, foi o resultado de que esse curso chegasse a conclusão. As pessoas incrivelmente boas e indiscutivelmente humanas, foram vocês as maiores responsáveis pelo amadurecimento da minha contínua construção pessoal e profissional, participaram intensamente nessa jornada até a concretização do meu sonho, e mantiveram minha crença de que podemos fazer uma sociedade melhor a nossa volta. Levarei comigo para sempre as palavras nobres e encorajadoras de que é possível o crescimento da ciência se pensarmos no bem coletivo. Almejo a carreira acadêmica e científica desde quando cursava a graduação, uma paixão que foi sustentada por inéditos formadores que passaram pela minha vida, e vocês solidificaram ainda mais esse sonho, depositando confiança, esperança e sabedoria.*

*Aos meus pais que tanto acreditaram e investiram nesse sonho. Ao meu namorado que nutre minha vida de amor todos os dias me mostrando que a vida é simples e fácil de vive-la quando temos determinação, disciplina e fé. A minha indescritível orientadora que me deu o privilégio de conhece-la e tornar sua aluna. Me orgulho de ter sido sua última orientada. E, ao Micássio, que acompanhou esse sonho desde o nosso primeiro contato a mais de 4 anos, participando de cada fase deste processo, tornando um verdadeiro amigo e professor nessa caminhada.*

*Minha eterna gratidão e admiração por vocês!*

## ***AGRADECIMENTOS***

Primeiramente a Deus por me amparar e guiar esta caminhada cheia de surpresas, pela saúde e força para que eu estivesse sempre determinada a realizar meu sonho e por me colocar sempre perto de pessoas de bem.

A todas as *pacientes* que gentilmente aceitaram fazer parte deste estudo, e terem contribuído com a ciência. Meu profundo sentimento de respeito e gratidão!

Aos meus amados pais, *Nelton Vaccaro Albiero e Elveni Reuse Albiero*, por terem acreditado em meu sonho e investido nele por esses anos. Pelas orações de proteção durante minhas avaliações. Pela paciência em vários momentos difíceis que nos cruzaram este período. Pelos princípios e valores que levarei por toda a vida. Obrigada por me fazerem chorar e sorrir sempre.

Às minhas irmãs *Luélyn Reuse Albiero, Thayane Reuse e Thayná Reuse* pelos momentos de compreensão, carinho e companhia.

Ao meu namorado *Robson Fortunato da Palma*, por toda compreensão nesses anos de tamanha distância, pela contínua fonte de apoio, conselhos, confiança, cuidado e carinho dado a mim. Pelo exemplo de pessoa que é. Foram seu amor, respeito e fé que me levantava nos momentos de dificuldade. Agradeço-lhe por me tornar mais feliz e amada!

À minha querida e admirável orientadora *Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim*, minha sincera gratidão pela orientação e contribuição na construção de mais uma etapa da minha formação. Pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Por não ter desistido de me acolher no final de sua carreira como professora. Pela oportunidade de assumir esse projeto, ao me presentear com uma pesquisa que envolveu pacientes e me manter próxima daquilo que amo, o ser humano. Por todo encorajamento, confiança e carinho depositados em mim ao longo desses dois anos. Pela fonte contínua de inspiração, ensinamentos e discussões deste trabalho. E pelas mensagens positivas, de conforto e reflexão nos momentos de alegria e angústias. Meu eterno obrigado!

Ao amigo *Dr. Micássio Fernandes de Andrade*, pela oportunidade de participar como aluna do curso de inverno em imunologia no ano de 2012 e conhecer a linha de pesquisa da Profa. Dra. Yara realizando um sonho na época. Pela companhia nos congressos da sociedade brasileira de imunologia IMMUNO 2012, IMMUNO 2013, IMMUNO 2014 e IMMUNO 2015. Por me amparar em sua casa durante o período de estudos para a seleção de mestrado. Pelo perfeito auxílio na escrita do projeto de mestrado e por todos os minuciosos ensinamentos com as metodologias utilizadas neste trabalho. Pelas valiosas discussões e apontamentos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, na qualificação de mestrado e apresentação no workshop de imunologia. Pela convivência saudável, a amizade sincera, os conselhos pessoais e profissionais, companheirismo nas horas de lazer e de moradia. Pelas correções excepcionais na escrita da dissertação. Enfim, você foi um importante contribuinte para meu crescimento científico e intelectual. Obrigada por absolutamente tudo!

À *Dra. Larissa Fávaro Marchi* pela colaboração com a concretização de vários experimentos deste projeto. Pelos ensinamentos sobre as metodologias, recrutamentos das pacientes e discussões de resultados obtidos. Pelo prazer de compartilhar a harmonia do trabalho

em grupo nas diversas tarefas que realizamos juntas no laboratório, por todo compromisso e fortalecimento da ciência em nosso grupo de pesquisa e pelo companheirismo em momentos de distração. Obrigada!

À farmacêutica *Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini*, pelos ensinamentos, competência e disposição em ajudar sempre. Pela parceria, nas inúmeras vezes que precisei na purificação de anticorpos. Pela companhia, amizade e deposição de palavras confortáveis nos meus momentos de derrota. Obrigada!

Aos professores *Dr. Flavio da Silva Emery* e *Dra. Monica Tallarico Pupo* da FCFRP-USP, pela síntese do Derivado 3-fenilcumarínico estudado.

A todos os *voluntários* doadores de sangue da FCFRP-USP, que contribuíram de forma determinante para a realização deste trabalho. Obrigada!

Aos Médicos do departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP *Dr. René Donizetti Oliveira*, *Dr. Sérgio Couto Luna de Almeida* e *Dr. Flávio Petean* pela atenção e valiosa contribuição para selecionar as pacientes para este estudo.

Aos Médicos residentes da Reumatologia, Imunologia, do HCFMRP-USP *Álvaro Henrique Neto*, *Barbara Seabra Carneiro*, *Caio Cavalcante Machado*, *Carlos Eduardo Kameki Sato*, *Flávio de Lima Falcão*, *Livia Machado Faria*, *Mônica Rossatti Molina*, *Raquel Vieira Dias*, *Renata Valente Lisboa* e *Taise de Oliveira Quaresma* pela colaboração na seleção das pacientes. Meus sinceros agradecimentos.

À técnica *Fabiana Rossetto de Moraes*, pelo auxílio na execução dos experimentos e análise de resultados de citometria de fluxo.

Ao técnico do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP, *Alcides Silva Pereira*, pela amizade, pela importante colaboração no preparo das soluções, organização dos materiais de laboratório e manipulação dos animais durante o desenvolvimento deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos Professores *Dr. Sérgio Akira Uyemura*, *Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez*, e *Dra. Andréia Machado Leopoldino* pela concessão e solicitude no uso de equipamentos em seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

Aos funcionários da FCFRP-USP, *Ana Cristina Morseli Polizello*, *Cristiana Bernadelli Garcia*, *Denise Cesário Damasceno*, *Luciana Ângulo Faria Rocha*, *Luciana Ceribelli* e *Nadir Mazzucato*, pela convivência agradável, atenção e auxílio.

Ao técnico do biotério da FCFRP *Reinaldo Fernando Batista*, pelos cuidados e alojamentos dos animais durante a realização desse trabalho.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, pela bolsa de estudos concedida para que fosse possível a realização do curso de mestrado (processo 130209/2015-5).

À secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP, *Ana Cristine Ferreira*, pela atenção e auxílio em todas as etapas do meu curso de mestrado.

Ao *programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo excelente ensino e programa, à *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto* e *Universidade de São Paulo* por fornecerem a infraestrutura e tecnologia necessária para o desenvolvimento técnico-científico deste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma passaram por minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje. Meu maior orgulho não é tudo o que aprendi e construí e sim que fiz tudo isso ao lado de pessoas excepcionais e insubstituíveis. Lembrarei eternamente dessa fase da vida e de cada um de vocês, sou muito feliz por fazerem parte de um capítulo da minha história!

Minha eterna gratidão a todos!

*“As mãos que servem são mais sagradas que os lábios que erram ou pregam.*

*Trabalho é benção, é vida. ”*

*(Filosofia do grupo de pesquisa)*

## RESUMO

ALBIERO, L. R. **6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, livre ou lipossomal, imunomodula funções efetoras de neutrófilos periféricos isolados de pacientes com artrite reumatoide e estimulados via receptores Fc  $\gamma$  e CR.** Dissertação. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017.123f.

A ativação de neutrófilos desencadeia os processos de fagocitose, metabolismo oxidativo, desgranulação, e formação e liberação de *neutrophil extracellular traps* (NETs), que atuam em conjunto na eliminação dos agentes infecciosos. Entretanto, em doenças autoimunes como a artrite reumatoide (AR), caracterizada pela deposição de complexos imunes na sinóvia, ocorre um intenso recrutamento e ativação local de neutrófilos, que agrava o quadro clínico da doença. Nesse contexto, a modulação das funções efetoras dos neutrófilos representa uma abordagem promissora para o tratamento adjuvante da AR. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13), sintetizado com base em metabólitos secundários de origem vegetal, modula negativamente o metabolismo oxidativo de neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, apresentando valores de  $CI_{50}$  – concentração necessária para inibir 50% da quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) – próximos a 1  $\mu$ M (na forma livre) e 3  $\mu$ M (incorporada em lipossomas). Em continuidade a essas investigações, na primeira parte deste trabalho foi avaliado o efeito modulador *in vitro* da C13, livre e/ou lipossomal, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, a desgranulação de elastase, e a formação e liberação de NETs, de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR, estimulados via receptores Fc $\gamma$  e/ou receptores do complemento. Na faixa de 1-3  $\mu$ M, a C13 livre e lipossomal inibiram aproximadamente 50% da QLlum, sem interferir nas demais funções efetoras dos neutrófilos avaliadas. Na concentração de 20  $\mu$ M, a C13 livre e lipossomal inibiram cerca de 50% da produção de HOCl, 60% da liberação de elastase, e 40% da formação e liberação de NETs. Na segunda parte deste trabalho, foi avaliada a toxicidade da C13 sobre neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR e de indivíduos saudáveis, sob condições de cultura (18 h, 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Em ambos os grupos, a C13 não alterou significativamente a viabilidade dos neutrófilos, que se manteve em torno de 80%, conforme avaliado pelos ensaios de exclusão do corante Azul de Tripan e determinação da atividade da enzima lactato-desidrogenase. Entretanto, a C13 modulou os estágios de morte dos neutrófilos, reduzindo a porcentagem de células apoptóticas e aumentando a porcentagem de células necróticas, analisadas por citometria de fluxo. Em neutrófilos de ambos os grupos, tratados ou não com C13, a porcentagem de células hipodiploides (média = 15%) e o nível de expressão do receptor CD64 permaneceram constantes, independentemente do tempo de cultura, mas o nível de expressão do receptor CD62L decaiu em função do tempo de cultura, conforme avaliado por citometria de fluxo. A análise conjunta dos resultados obtidos indica que o derivado 3-fenilcumarínico C13 pode servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com possível utilização no tratamento adjuvante de doenças com participação ativa dos neutrófilos, como a AR.

**Palavras-chave:** Neutrófilo, artrite reumatoide, 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, antioxidante, imunocomplexo, lipossoma.

## ABSTRACT

ALBIERO, L. R. **Free and liposomal 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin immunomodulate the effector functions of rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils stimulated via Fc-gamma and CR receptors.** Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017. 123f.

Neutrophil activation triggers the processes of phagocytosis, oxidative metabolism, degranulation, and formation and release of neutrophil extracellular traps (NETs), which act in concert to eliminate the infectious agents. However, in autoimmune diseases like rheumatoid arthritis (RA), characterized by synovial deposition of immune complexes, there is a massive local recruitment and activation of neutrophils, which aggravates the clinical scenario of the disease. In this sense, modulation of the effector functions of neutrophils represents a promising approach for the adjuvant treatment of RA. Previous studies from our research team have demonstrated that the 3-phenylcoumarin derivative 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin (C13), which was synthesized based on plant secondary metabolites, negatively modulates the oxidative metabolism of healthy individuals' peripheral blood neutrophils, giving IC<sub>50</sub> values – concentration required to inhibit the luminol-enhanced chemiluminescence (CLlum) by 50% – of nearly 1 μM and 3 μM in the free and liposomal forms, respectively. To continue these investigations, in the first part of the present study we examined the *in vitro* modulating effect of free and/or liposomal C13 on the reactive oxygen species generation, degranulation of elastase, and formation and release of NETs, in RA patients' peripheral blood neutrophils, stimulated via Fcγ and/or complement receptors. At the concentration range of 1-3 μM, free and liposomal C13 suppressed CLlum by approximately 50%, without interfering in the other neutrophil effector functions here investigated. At 20 μM, free and liposomal C13 inhibited nearly 50% of HOCl production, 60% of elastase release, and 40% of the NETs formation and release. In the second part of this study, we examined the toxicity of C13 towards peripheral blood neutrophils from RA patients and healthy individuals, under culture conditions (18 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). In both groups, C13 did not significantly altered the neutrophil viability, which remained about 80%, as assessed by the Trypan Blue exclusion test and determination of lactate dehydrogenase activity. However, C13 modulated the neutrophil death stages – it lowered the percentage of apoptotic cells and increased the percentage of necrotic cells – as analyzed by flow cytometry. In neutrophils from both groups, treated or not with C13, the percentage of hypodiploid cells (mean = 15%) and the level of CD64 receptor expression remained constant regardless of the culture time, but the level of CD62L receptor expression decreased with culture time, as assessed by flow cytometry. Together, our results indicate that the 3-phenylcoumarin derivative C13 can be used as a prototype for the development of novel drugs with possible application in the adjuvant treatment of diseases in which neutrophils actively participate, such as RA.

**Keywords:** Neutrophil, rheumatoid arthritis, 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin, antioxidant, immune complex, liposome.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APAF	Fator Ativador de Protease de Apoptose
ANOVA	Análise de variância
AR	Artrite reumatoide
Bax, Bak	Proteínas pró-apoptóticas
BSA	Albumina Sérica Bovina
c.p.m	Contagem de fótons por minuto
C13	6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina
C3b, C3bi, C5a	Fragmentos de ativação do sistema complemento
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da resposta biológica
CD	Cluster de diferenciação
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CER	Centro de Reabilitação
CFD	Diluyente de Fixação do Complemento
CHOL	Colesterol (do inglês “cholesterol”)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CR	Receptor de Complemento
CR1, CR2, CR3 e CR4	Receptores de complemento tipo 1, 2, 3 e 4
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DAPI	4,6 diamino-2-fenilindol
DAS	Índice de atividade da doença
DEAE	Dietilaminoetil
DMARDs	Drogas anti-reumáticas capazes de modificar a doença (do inglês, Disease modifying antirheumatic drugs)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribinonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
DNase	Enzima de clivagem do DNA
DPI	Difenileno-iodônio

EI	Eficiência de incorporação
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
Fc $\gamma$ R	Receptor para a porção Fc de IgG
Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII	Isoformas de receptores Fc $\gamma$
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução balanceada de Hank's (do inglês, Hank's balanced salt solution)
HC	Hospital das clínicas
HOCl	Ácido hipocloroso
IC (s)	Imunocomplexo (s)
IC IgG-OVA	Imunocomplexo de ovoalbumina e IgG anti-ovoalbumina
IC IgG-OVA/SHAr	Imunocomplexo de ovoalbumina e IgG anti-ovoalbumina, opsonizado com soro humano de artrite
IC IgG-OVA/SHN	Imunocomplexo de ovoalbumina e IgG anti-ovoalbumina, opsonizado com soro humano normal
IgG	Imunoglobulina da classe G
iIC	Imunocomplexos imobilizado
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LTB-4	Leucotrieno B4
LUV	Lipossoma (Large unilamellar vesicles, da sigla em inglês)
LPS	Lipopolissacarídeo
M.M.	Massa molecular
MOMP	Permeabilização da Membrana mitocondrial externa
m/v	Massa sobre o volume
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
N(H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio

NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NETs	Redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, neutrophil extracellular traps)
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
nm	Nanômetro
NSAIDs	Drogas Anti-inflamatórias Não-esteroidais (do inglês, non steroidal anti-inflammatory drug)
O <sub>2</sub> •-	Ânion superóxido
OVA	Ovoalbumina
PAF	Receptor Ativador de Plaquetas (do inglês, platelet activating factor)
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBST	Solução salina tamponada com fosfato com Tween
PC	Fosfatidilconina de soja
PdI	Índice de poli dispersão
PE	Ficoeritrina
pH	potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídeo
PICD	Morte celular induzida por fagocitose (do inglês, phagocytosis induced cell death)
PMA	Acetato miristato de forbol (do inglês, phorbol 12-myristate 13-acetate)
PMNs	Polimorfonucleares
p-NA	p-Nitroanilina
PSGL-1	Ligante 1 da Glicoproteína P-selectina
QL	Quimiluminescência
QLlum	Quimiluminescência dependente de luminol
R <sub>F</sub>	fator de Retenção

SAAVNA	Nsuccinil-Ala-Ala-Val- <i>p</i> -nitroanilida
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
Taurina-Cl	Taurina Cloramina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	Tetrametilenodiamino
TLR	Receptor do tipo Toll
TMB	3,3-5,5-tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral tipo $\alpha$
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF
UV	Ultravioleta
Zi	Zimosan
Ziops	Zimosan opsonizado

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Núcleo fundamental dos derivados 3-fenilcumarínicos.	12
Figura 3.1.	Estrutura química de 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13).	26
Figura 4.1.	Perfil cromatográfico de soro imune rico em IgG anti-OVA, obtido em coluna de DEAE-celulose.	37
Figura 4.2.	Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA em gel de poliacrilamida com SDS.	38
Figura 4.3.	Curva de logaritmo da massa molecular (log MM) em função do fator de retenção ( $R_F$ ) das proteínas separadas por eletroforese.	38
Figura 4.4.	Curva de precipitação de imunocomplexos formados de IgG anti-OVA (diluído 1:2) e OVA em diferentes diluições, para determinação quantitativa do ponto de equivalência.	39
Figura 4.5.	Perfis cinéticos representativos de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via $Fc\gamma$ ou $Fc\gamma R+CR$ .	43
Figura 4.6.	Valores de Área Integrada e de Porcentagem de Inibição de Quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via $Fc\gamma R$ ou $Fc\gamma R+CR$ .	44
Figura 4.7.	Perfis cinéticos representativos de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 encapsuladas em lipossomas (C13 LUV) e estimulados via $Fc\gamma$ ou $Fc\gamma R+CR$ .	47
Figura 4.8.	Valores de Área Integrada e de Porcentagem de Inibição de Quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos periféricos de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 incorporada em lipossomas (C13 LUV) e estimulados via $Fc\gamma R$ ou $Fc\gamma+CR$ .	48

Figura 4.9.	Valores da Oxidação do TMB e da Porcentagem de TMB oxidado pela Taurina-cloramina proveniente da produção de HOCl pela MPO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via CR com zimosan opsonizado.	50
Figura 4.10.	Perfil cinético representativo da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos, de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados previamente com C13 livre ou incorporada em lipossomas e estimulados via FcγR.	51
Figura 4.11.	Valores de absorvância e de Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados previamente com C13, livre ou incorporada em lipossomas, e estimulados via FcγR.	52
Figura 4.12.	Quantificação da liberação de DNA de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados com C13, na forma livre, e estimulados via FcγR.	53
Figura 4.13.	Visualização da formação e liberação de Redes Extracelulares de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados com C13, na forma livre, e estimulados via FcγR.	55
Figura 4.14.	Determinação da Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) do sobrenadante de cultura de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR incubados com a C13 por 18 horas.	59
Figura 4.15.	Viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR incubados com C13 em condições de cultura, por 18 horas: análise do índice de apoptose e necrose utilizando citometria de fluxo.	60
Figura 4.16.	Porcentagem de células hipodiplóides provenientes de sangue periférico de pacientes com AR e incubados com C13 em condições de cultura por 18 horas.	61
Figura 4.17.	Mediana de Intensidade de Fluorescência relacionada à expressão dos receptores de membrana celular CD64 e CD62L de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR e incubados com C13 em condições de cultura por 0 e 18 horas.	63

Figura 6.1. Esquema representativo do efeito imunomodulador do Derivado 3- fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide, estimulados via receptor FC $\gamma$ R e CR.

73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.	Caracterização físico-química de lipossomas compostos de PC:CHOL na proporção de massa de 5:1, vazios e contendo a C13, pela determinação do tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e Eficiência de Incorporação (EI).	40
Tabela 4.2.	Avaliação do efeito citotóxico do derivado 3-fenilcumarinico sobre os neutrófilos de pacientes com AR mantidos em cultura por 18 horas.	58

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Aspectos gerais da fisiologia dos neutrófilos</b> .....	2
<b>1.2. Receptores dependentes de opsonização</b> .....	3
<b>1.2.1. Receptores Fc<math>\gamma</math></b> .....	3
<b>1.2.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento</b> .....	4
<b>1.3. Metabolismo Oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)</b> .....	5
<b>1.4. O processo de desgranulação</b> .....	5
<b>1.5. NETs: formação e liberação</b> .....	6
<b>1.6. Apoptose</b> .....	7
<b>1.7. Artrite Reumatoide</b> .....	9
<b>1.8. Derivados 3-fenilcumarínicos</b> .....	12
<b>1.9. Incorporação de compostos fenólicos em lipossomas</b> .....	13
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>III. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	18
<b>3.1. Sujeitos da Pesquisa</b> .....	19
<b>3.2. Obtenção de material biológico</b> .....	19
<b>3.3. Aspectos éticos</b> .....	19
<b>3.4. Obtenção do soro humano normal (SHN) e soro humano de artrite (SHAr)</b> .....	20
<b>3.5. Obtenção de leocócitos polimorfonucleares humanos - Neutrófilos</b> .....	20
<b>3.6. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos</b> .....	21
<b>3.6.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA</b> .....	21
<b>3.6.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA</b> .....	21
<b>3.6.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA</b> .....	22
<b>3.6.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo</b> .....	23
<b>3.7. Preparação dos estímulos</b> .....	23
<b>3.7.1. Preparação de Imunocomplexos (IC)</b> .....	23
<b>3.7.2. Preparação de Imunocomplexos precipitados</b> .....	23
<b>3.7.3. Preparação de Imunocomplexos Imobilizados (iIC)</b> .....	24
<b>3.7.4. Opsonização de Imunocomplexos precipitados</b> .....	24

3.7.5. Preparação Zimosan opsonizado (ZIops).....	25
3.8. Síntese do derivado 3-fenilcumarínico utilizado no estudo .....	25
3.9. Preparo de lipossomas e caracterização físico-química dos LUV .....	26
3.10. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via receptores FcγR ou FcγR+CR.....	27
3.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via CR.....	28
3.12. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o processo de desgranulação de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FCγR .....	29
3.13. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o processo de formação de Redes extracelulares de Neutrófilos (NETs) de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FCγR.....	30
3.13.1. Análise quantitativa da formação e liberação das NETs.....	30
3.13.2. Análise qualitativa da formação e liberação das NETs .....	30
3.14. Investigação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em cultura .....	31
3.14.1. Análise do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico pelo método de exclusão ao corante azul de Tripan.....	31
3.14.2. Análise do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico pelo método de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) .....	32
3.14.3. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI) em citometria de fluxo .....	32
3.14.4. Análise da alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos em citometria de fluxo .....	33
3.14.5. Análise da expressão de receptores de membrana CD62L e CD64, relacionados com o nível de ativação celular de neutrófilos .....	33
3.15. Análise de dados .....	34
IV. RESULTADOS .....	35
PARTE I: Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA, Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA e Caracterização Físico-química das vesículas lipossomais utilizadas no estudo .....	36
4.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA e caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA .....	37

4.1.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA.....	37
4.1.2. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	37
4.2. Caracterização físico-química das vesículas e determinação da eficiência de incorporação do composto fenólico em lipossomas.....	39
<b>PARTE II: Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, livre e incorporado em vesículas lipossomais, em funções efectoras de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados com diferentes tipos de Imunocomplexos .....</b>	<b>41</b>
4.3. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre as funções efectoras de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide.....	42
4.3.1. A C13, na forma livre, modula negativamente a produção de ERO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via Fc $\gamma$ R ou Fc $\gamma$ R+CR.....	42
4.3.2. A C13, incorporada em lipossomas, mantêm a capacidade de modular negativamente a produção de ERO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via Fc $\gamma$ R ou Fc $\gamma$ R+CR.....	45
4.3.3. A C13, na forma livre, modula negativamente a atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via CR .....	49
4.3.4. A C13, livre e incorporada em lipossomas, modula negativamente a desgranulação de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via Fc $\gamma$ R.....	50
4.3.5. A C13, na forma livre, modula negativamente a formação e liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via Fc $\gamma$ R .....	52
<b>PARTE III: Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência e morte de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em condições de cultura .....</b>	<b>56</b>
4.4. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em condições de cultura.....	57
4.4.1. A C13 não afeta a viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos sob condições de cultura, e avaliados pelo método de exclusão ao corante azul de Tripan.....	57
4.4.2. A C13 não afeta a viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura, e avaliados pelo método de liberação da enzima LDH .....	58
4.4.3. A C13 altera o índice de apoptose e necrose de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados	

<b>utilizando anexina V-APC e iodeto de propídio propídio (PI) em citometria de fluxo</b> .....	59
<b>4.4.4. A C13 não altera o conteúdo de DNA de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados por meio de Hipodiploidia</b> .....	60
<b>4.4.5 A C13 não altera a expressão dos receptores de membrana CD64 e CD62L de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados utilizando citometria de fluxo</b> .....	61
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>VI. CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
<b>ANEXOS</b> .....	96
<b>ANEXO I – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo</b> .....	97
<b>ANEXO II - Parecer do Comitê de ética da Instituição proponente (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo)</b> .....	98
<b>ANEXO III – Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais</b> .....	99

# **I. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Aspectos gerais da fisiologia dos neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes nos seres humanos, considerados os primeiros a migrar até o local da infecção para montar uma resposta imunológica contra bactérias, fungos e protozoários (Bardoel *et al.*, 2014; Grayson e Kaplan, 2016; Hahn *et al.*, 2016). Eles apresentam núcleo segmentado multi-lobulado com 3 a 5 lóbulos, por isso são chamados também de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) (Bardoel *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015). Os neutrófilos possuem um arcabouço de mecanismos como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação do conteúdo microbicida dos seus grânulos que promovem a eliminação dos agentes infecciosos (Nguyen-Jackson *et al.*, 2010; Kolaczowska e Kubes, 2013; Mocsai, 2013; Bardoel *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Grayson e Kaplan, 2016).

Os grânulos, que caracterizam os neutrófilos são classificados em primários, secundários, terciários e vesículas secretórias. Eles são produzidos durante a diferenciação granulocítica dessas células na medula óssea que acontece da seguinte forma: inicialmente, as células da linhagem mielóide que originará os neutrófilos, são diferenciadas em pró-mielócitos e os grânulos formados são os primários ou azurófilos (os quais contêm diversos componentes de defesa como as enzimas mieloperoxidase, elastase e catepsina G). Em seguida, são diferenciadas em mielócitos e formam os grânulos secundários ou específicos (que contêm colagenase, fosfatase alcalina, lactoferrina, gelatinase, lisozima e o complexo enzimático da NADPH oxidase). Posteriormente, são diferenciados à metamielócitos e produzidos os grânulos terciários ou de gelatinase (que se assemelham aos secundários, porém com altas concentrações de gelatinase). Finalmente, no quarto e último estágio, são formados os neutrófilos segmentados e se origina as vesículas secretórias. Essas vesículas são altamente mobilizáveis, e em sua superfície contêm componentes enzimáticos, receptores de membrana, moléculas de adesão, proteínas sinalizadoras e antimicrobianas. Os grânulos são liberados na ordem inversa à apresentada no seu desenvolvimento, sendo as vesículas secretórias as primeiras a serem liberadas, seguidas pelos grânulos terciários, secundários e primários, respectivamente (Meyer-Hoffert *et al.*, 2004; Van Der Veen *et al.*, 2009; Borregaard, 2010; Bugl *et al.*, 2013; Pruchniak *et al.*, 2013; Mayadas *et al.*, 2014; Wang e Arase, 2014).

Após sua maturação e diferenciação, os neutrófilos são capazes de deixar a medula óssea e entrar na corrente sanguínea. Na corrente sanguínea, eles não se dividem e sobrevivem em

média de 7 a 8 horas no organismo em homeostase, enquanto que num ambiente inflamatório, seu tempo de vida persiste por receber estímulos anti-apoptóticos (Borregaard, 2010; Cascao *et al.*, 2010; Bardoel *et al.*, 2014; Nauseef e Borregaard, 2014; Wang e Arase, 2014; Pruchniak *et al.*, 2015; Grayson e Kaplan, 2016; Viryasova *et al.*, 2016).

## **1.2. Receptores dependentes de opsonização**

### **1.2.1. Receptores Fc $\gamma$**

Os receptores da família Fc $\gamma$  ligam-se na porção Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulinas da classe G (IgG), possibilitando o reconhecimento de patógenos ou componentes particulados, opsonizados com IgG. Esses receptores, quando associados a seus ligantes, podem ativar respostas como a fagocitose, a desgranulação e a ativação do metabolismo oxidativo (Dai *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2009; Aschermann *et al.*, 2010; Lux *et al.*, 2010; Futosi *et al.*, 2013). Eles são classificados em Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) - subdividido em Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb e Fc $\gamma$ RIIc - e Fc $\gamma$ RIII (CD16) - subdividido em Fc $\gamma$ RIIIa e Fc $\gamma$ RIIIb. Ambos se diferem quanto à afinidade pela IgG, distribuição tecidual, e nível de expressão (Bruhns *et al.*, 2009; Dai *et al.*, 2009; Lux *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Futosi *et al.*, 2013).

Os neutrófilos apresentam de forma constitutiva dois desses receptores envolvidos na sua ativação, Fc $\gamma$ RIIa e Fc $\gamma$ RIIIb. O Fc $\gamma$ RI passa a ser expresso na membrana dos neutrófilos quando estes são ativados por citocinas inflamatórias, como o interferon- $\gamma$ . Ele é um receptor de alta afinidade e reconhece IgG monomérica (Van Der Poel *et al.*, 2011; Futosi *et al.*, 2013).

O Fc $\gamma$ RIIa é um receptor de baixa afinidade que reconhece IgG complexada ao antígeno (IC), estimula a fagocitose, e desencadeia as etapas subsequentes que levam à formação do fagolisossoma, com a liberação do conteúdo lisossomal (desgranulação), tanto intra como extracelular (Ramsland *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Através desses mecanismos, o Fc $\gamma$ RIIa participa na eliminação de patógenos opsonizados por componentes do soro (Clark e Petty, 2010; Futosi *et al.*, 2013). O neutrófilo também possui o Fc $\gamma$ RIIb, que é um receptor inibitório, que pode aumentar a gravidade de algumas doenças como a artrite reumatoide, quando ausentes (Belostocki *et al.*, 2005; Aschermann *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010).

O Fc $\gamma$ RIIIb também é um receptor de baixa afinidade, com importante participação na produção de ERO em doenças mediadas por IC (Radstake *et al.*, 2006; Futosi *et al.*, 2013).

## 1.2.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento

As células fagocíticas expressam em suas membranas receptores para componentes solúveis do complemento (CR), que auxiliam no processo de fagocitose, pois tais componentes atuam opsonizando partículas que serão fagocitadas. Esses receptores são: CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18; Mac-1) e CR4 (CD11c/CD18). Sendo que os neutrófilos expressam os receptores CR1, CR3 e CR4 (Huang *et al.*, 2011 ; O'brien *et al.*, 2012; Merle *et al.*, 2015).

Os receptores CR1 induzem fagocitose pela ligação principalmente de fragmentos C3b, C4b, e em menor atividade a C3bi. Esses componentes são produzidos pela quebra de fatores solúveis em resposta a infecções e a sua ligação ao CR1 ativa vias de transdução de sinais relacionados à ativação de mecanismos microbicidas (Ricklin *et al.*, 2010; Camous *et al.*, 2011; Merle *et al.*, 2015).

Os CR3 são ativados durante a resposta inicial a infecções preferencialmente pela ligação à C3bi, o qual recobre a superfície de patógenos e células apoptóticas (Whitlock *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2011; O'brien *et al.*, 2012). Eles atuam na quimiotaxia de neutrófilos, ocorrendo acúmulo dessas células no sítio inflamatório, e consequente eventos microbicidas como a polimerização do citoesqueleto de actina, produção de ERO, fagocitose e desgranulação (Ross, 2002; Xia *et al.*, 2002; Preynat-Seauve *et al.*, 2004; Sebe-Pedros *et al.*, 2010). Tanto CR1 como CR3 possuem expressão elevada na membrana de neutrófilos do fluido sinovial de pacientes com AR (Barrington *et al.*, 2001; Carroll e Sim, 2011).

Os CR exercem outras funções, além da promoção da fagocitose. Os CR1 atuam na regulação das cascatas das vias clássica e alternativa do complemento, inibindo essas vias através da interferência na estabilização das convertases, bem como participam da eliminação de complexos imunes da circulação, por facilitar a ligação dos mesmos aos eritrócitos (Hepburn *et al.*, 2004; Khera e Das, 2009).

Os FcγR e CR3 podem cooperar na ativação do metabolismo oxidativo de neutrófilos, ou seja, esses receptores em conjunto desencadeiam uma maior produção de ERO do que cada um dos tipos de receptores separadamente, seguindo a ordem decrescente FcγR+CR > FcγR > CR para o padrão de resposta (Moreira *et al.*, 2007; Mocsai *et al.*, 2010; Zárbock e Ley, 2011). Esse sinergismo é indispensável para uma resposta adequada a agentes infecciosos. Entretanto, a produção acentuada de ERO pode ser prejudicial em doenças inflamatórias que envolvem a

infiltração de neutrófilos associada à deposição tecidual e o acúmulo de IC, como na artrite reumatoide e no Lúpus Eritematoso Sistêmico (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; Ballanti *et al.*, 2011; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

### **1.3. Metabolismo Oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)**

A ativação dos neutrófilos leva a um aumento brusco no consumo de oxigênio, um processo denominado “burst” oxidativo ou explosão respiratória (Pruchniak *et al.*, 2013; Mayadas *et al.*, 2014). O processo inicia-se pela ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase que transfere elétrons para o  $O_2$ , reduzindo-o a radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que é a primeira espécie reativa de oxigênio formada e a fonte das demais ERO produzidas durante a fagocitose (De Oliveira *et al.*, 2011; Pruchniak *et al.*, 2013). Assim, o superóxido produzido pela redução do  $O_2$  catalisado pela NADPH oxidase pode ser convertido espontaneamente ou por ação enzimática da superóxido dismutase em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O superóxido pode ainda reagir com o  $H_2O_2$ , na presença de ferro, formando radical hidroxila ( $HO\bullet$ ) ou ainda, o  $H_2O_2$  pode servir de substrato para a enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO uma hemeperoxidase encontrada somente em neutrófilos, está localizada nos grânulos primários (azurófilos). Durante ativação celular e desgranulação, a MPO pode ser liberada no fagossoma ou no meio extracelular. Essa hemeperoxidase, na presença de íons cloreto, produz ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies halogenadas que têm um poder microbicida muito maior do que as ERO produzidas anteriormente (Lambeth, 2004; El-Benna *et al.*, 2010; Mayadas *et al.*, 2014; Grigorieva *et al.*, 2016; Odobasic *et al.*, 2016).

### **1.4. O processo de desgranulação**

Após a fagocitose dos agentes infecciosos, ocorre a fusão das vesículas citoplasmáticas de conteúdo granular dos neutrófilos com a membrana plasmática ou com a membrana do fagolisossoma em formação. Isso permite a exocitose de grânulos líticos e desencadeia uma das principais funções efetoras dessas células na defesa do organismo, a desgranulação. Esse processo está diretamente ligado a mecanismos celulares que culminam na morte, destruição e eliminação dos patógenos como, o aumento da expressão de receptores de membrana, a ativação de vias de sinalização intracelular, o auxílio no processo de fagocitose e a produção de ERO

(Kolaczowska e Kubes, 2013; Pruchniak *et al.*, 2013; Bardoel *et al.*, 2014; Kluter *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2016).

A desgranulação é induzida por diversos agentes como, fMLP, lipopolissacarídeo (LPS), TNF- $\alpha$ , proteínas do complemento, imunoglobulinas da classe G (IgG) (Yang *et al.*, 2009; Kustiawan *et al.*, 2016; Surmiak e Sanak, 2016). Nos neutrófilos, os grânulos são principalmente proteínas antimicrobianas, como a defensina e a lisozima (com ação lítica sobre a superfície bacteriana) e as serino-proteases, como a elastase (que degradam proteínas de bactérias e fungos) (Pruchniak *et al.*, 2013; Bardoel *et al.*, 2014; Stapels *et al.*, 2015; Kustiawan *et al.*, 2016).

Em processos inflamatórios crônicos como na artrite reumatoide, a elastase perpetua a inflamação, e é considerada uma das principais enzimas responsáveis pela destruição tecidual. Desta forma, esta enzima parece ser um importante alvo para a terapia de doenças inflamatórias crônicas (Beyer e Melzig, 2005).

### **1.5. NETs: formação e liberação**

Até o século passado, o conhecimento científico sobre a resposta imune dos neutrófilos, estava limitado a fagocitose do patógeno, a subsequente morte e destruição do mesmo e consequente ação antimicrobiana. Com o avanço da ciência, novos conhecimentos acerca dos mecanismos efetores dessas células foram observados, como a capacidade que as mesmas têm de liberar o seu conteúdo de DNA, associado à histonas e proteínas dos grânulos citoplasmáticos (elastase e mieloperoxidase), formando as conhecidas Redes Extracelulares de DNA (NETs, da sigla em inglês para “Neutrophil Extracellular Traps”) (Grayson e Kaplan, 2016; Hahn *et al.*, 2016). Quando o agente patogênico é persistente e não eliminado pelos mecanismos microbicidas clássicos, os neutrófilos lançam as NETs (Kraaij *et al.*, 2016). A formação das NETs está relacionada com o tamanho do antígeno, seja ele um patógeno ou uma molécula orgânica (Branzk *et al.*, 2014). Quanto maior é este, mais dificuldade essas células terão para fagocitá-lo e mais NETs serão formadas e liberadas para sua destruição e eliminação (Branzk *et al.*, 2014).

As NETs são formadas quando os neutrófilos são ativados com agentes farmacológicos, como o PMA; citocinas, como IL-8 e TNF- $\alpha$ ; Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) como, LPS e fMLP e o fator de ativação de plaquetas (PAF) (Zawrotniak e Rapala-

Kozik, 2013; Pruchniak *et al.*, 2015). Além dos estímulos citados, estão incluídos também microrganismos: bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Shigella flexneri* (Brinkmann *et al.*, 2004; Pilszczek *et al.*, 2010; Grayson e Kaplan, 2016); alguns fungos como, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Aspergillus fumigatus*; e parasitas como, *Toxoplasma gondii* (Kraaij *et al.*, 2016) e *Leishmania donovani* (Gabriel *et al.*, 2010). E, mais recentemente foi visto que as NETs podem também ser produzidas e liberadas sob estímulos de imunocomplexos (Behnen *et al.*, 2014; Aleman *et al.*, 2016).

O processo de formação e liberação das NETs se dá por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas na célula, incluindo a separação dos lóbulos nucleares, a descondensação da cromatina, a modificação de histonas, o desprendimento da membrana nuclear e a migração de grânulos para o núcleo (elastase e mieloperoxidase) (Grayson e Kaplan, 2016). A mobilização das proteínas granulares é regulada pelo status redox da célula, mostrando que a produção de ERO é importante para a formação das NETs (Fuchs *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2010; Nishinaka *et al.*, 2011; Keshari *et al.*, 2013; Grayson e Kaplan, 2016). A enzima elastase também é importante para a formação das NETs por facilitar a degradação de histonas ligadas ao material genético, o que promove a liberação do DNA e a descondensação do mesmo. A MPO por sua vez, tem participação nesse processo, por facilitar a liberação da elastase dos grânulos azurófilos e promover a reorganização do citoesqueleto de actina (Metzler *et al.*, 2014).

## **1.6. Apoptose**

Quando da realização das funções efectoras ou após 8 horas sem ativação na corrente sanguínea, os neutrófilos entram em apoptose (Strydom e Rankin, 2013; Viryasova *et al.*, 2016). A apoptose é o mecanismo pelo qual a célula promove sua autodestruição de forma programada, e tem papel importante na homeostase do sistema imunológico, balanceando a taxa de divisão e morte das células, já que o acúmulo de células indesejáveis pode levar ao mau funcionamento de sistemas e ocasionar diversas patologias. É, também, o principal mecanismo de controle da intensidade da resposta inflamatória, limitando sua duração e prevenindo lesão tecidual provocada pela permanência prolongada de células pró-inflamatórias no local de injúria (Jancinova *et al.*, 2012; Bardoel *et al.*, 2014; Luan *et al.*, 2015).

A apoptose se dá por meio de vias sinalizadoras que ativam um conjunto de proteases intracelulares chamadas caspases, que levam a uma série de mudanças morfológicas e

bioquímicas sofridas pelas células, como condensação da cromatina, ruptura do núcleo, contração do citoplasma, alterações na simetria sem perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação da célula em corpos menores (corpos apoptóticos), bem como a clivagem do material genético e despolarização mitocondrial (Vermees *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2006; Kobayashi e Deleo, 2009; Wang e Arase, 2014). A membrana das células apoptóticas sofre modificações, de modo a facilitar o processo de fagocitose por macrófagos, porém permanece intacta, pois é imprescindível para evitar a liberação de componentes intracelulares tóxicos que promovem a ativação do processo inflamatório, favorecendo, assim, a restauração da homeostase do sistema (Wang e Arase, 2014; Jie *et al.*, 2016).

Neutrófilos podem sofrer apoptose pela ativação das vias intrínseca, extrínseca e morte celular induzida por fagocitose (phagocytosis-induced cell death - PICD, da sigla em inglês) (Whitlock *et al.*, 2000; Kennedy e Deleo, 2009; Nikolettópoulou *et al.*, 2013). A via intrínseca ou apoptose espontânea (intracelular) acontece quando células senis sofrem permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, que se oligomerizam na membrana mitocondrial externa e formam poros, alterando o potencial de membrana, e liberando o citocromo C e o fator ativador de protease de apoptose (APAF) para o citosol, culminando com a formação do apoptossomo, a ativação da caspase-9 e caspase-3 (Barcellos-De-Souza *et al.*, 2012; Pliyev e Menshikov, 2012; Gautam *et al.*, 2013; Rossi e Lord, 2013). A via extrínseca (extracelular) é iniciada pela ligação e agregação de fatores externos como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a ligação de Fas ao seu receptor específico e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) aos receptores de morte presentes na membrana plasmática, formando um complexo indutor de morte associado ao receptor, recrutando e ativando caspase-8 e caspase-3 (Kennedy e Deleo, 2009; Nikolettópoulou *et al.*, 2013). Já a via dependente de fagocitose é acionada pela fagocitose de partículas e microrganismos, subsequente ativação da NADPH-oxidase e produção de (ERO) e a liberação da protease catepsina presente nos grânulos azurófilos para o citoplasma da célula. A catepsina por sua vez, inibe as proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e ativa proteínas pró-apoptóticas como a caspase 8 (Kennedy e Deleo, 2009; Nikolettópoulou *et al.*, 2013; Viryasova *et al.*, 2016). A produção do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio podem influenciar na sobrevivência dos neutrófilos, apresentando aumento na porcentagem de células em apoptose. Dessa forma, o

balanço redox da célula está intimamente conectado na regulação de fatores de transcrição de proteínas anti e pró-apoptóticas (Barcellos-De-Souza *et al.*, 2012).

Um conjunto de receptores de membrana estão relacionados com os estágios de sobrevivência dos neutrófilos entre eles, os receptores de ativação FcγRIIIb (CD16), que estão presentes em grande número na superfície celular de neutrófilos viáveis (100.000 – 200.000 moléculas por célula) e que diminui com a redução da capacidade funcional dessas células (Futosi *et al.*, 2013; Pincetic *et al.*, 2014). Outro marcador de ativação celular são os receptores CD64, que são expressos somente quando as células são ativadas (Titova *et al.*, 2015; Dang *et al.*, 2016). Outro grupo são as selectinas. A L-selectina (CD62L) participa da adesão e rolamento dos neutrófilos no início da resposta inflamatória e após a ativação celular e a exposição a estímulos inflamatórios, estes receptores são clivados, diminuindo sua expressão (Boer *et al.*, 2010; Futosi *et al.*, 2013). Por outro lado, à medida que os neutrófilos envelhecem, reduz-se a expressão em sua membrana celular dessa molécula (Wang *et al.*, 2010; Futosi *et al.*, 2013).

### **1.7. Artrite Reumatoide**

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e sistêmica, que atinge entre 0,5-1,0% da população mundial e tem maior predominância em mulheres com idade entre 30 e 55 anos. É caracterizada pela formação de nódulos cutâneos, vasculite e sinovite poliarticular, de distribuição simétrica e com grande potencial deformante podendo dificultar ou impossibilitar as funções habituais das articulações e redução na qualidade de vida (Cascao *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010; O'dell, 2015; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

A progressão desses sinais que caracterizam a doença, se dá pela formação de uma rede extensa de vasos sanguíneos na membrana sinovial induzida por macrófagos. Concomitante a isso, células T CD4 e CD8, células B, linfoblastos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos sofrem diapedese pelas vênulas e se alojam na membrana sinovial, induzindo a neovascularização (Cascao *et al.*, 2010; Pollono *et al.*, 2010). Tudo isso contribui para o aspecto edematoso das sinóvias, caracterizando hiperplasia do revestimento sinovial, com neoangiogênese abundante, ativação de células endoteliais que iniciam a produção de moléculas de adesão e quimiocinas que por sua vez, facilitam o influxo de células adicionais, entre elas, 90% neutrófilos (Gorman e Criswell, 2002; Ji *et al.*, 2002; Krumbholz *et al.*, 2005; Takayanagi, 2012; O'dell, 2015; Smolen *et al.*, 2016). Esse influxo de células e a neoangiogênese leva a formação do “panus”

que é um conjunto de células ativadas como fibroblastos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, culminando no aumento da concentração de citocinas, quimiocinas e prostaglandinas e levando a ativação de osteoclastos, provocando reabsorção óssea, erosão da cartilagem e estresse oxidativo (Hitchon e El-Gabalawy, 2004; Wright *et al.*, 2014).

Diversas teorias têm sido sugeridas para determinar uma causa da AR, pois a etiologia ainda não é bem definida. Dentre os mecanismos envolvidos na patogenia da AR, destacam-se as participações de fatores ambientais, imunológicos e imunogenéticos. Entre os fatores ambientais que podem iniciar a AR, algumas bactérias e vírus estão implicados como possíveis candidatos (Abe e Takeuchi, 2001; Christen e Von Herrath, 2005; Shoenfeld, 2009). Entre os fatores imunológicos estão, a presença de imunoglobulinas (Ig) alteradas, o fator reumatoide (FR) e os anticorpos anti-peptídeos cíclicos citrulinados (anti-CCP) (Abe e Takeuchi, 2001; Ioan-Facsinay *et al.*, 2011; Willemze *et al.*, 2012; Cantaert *et al.*, 2013).

Estímulos quimiotáticos presentes no fluido sinovial, como leucotrienos (LTB<sub>4</sub>), produtos bacterianos (fMLP), citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNF), complexos imunes (IC), e componentes do complemento (C3b, C5a) são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o local, levando a ativação exacerbada e prolongada dessas células, bem como alterações na sua vida média, o que contribuem para o dano tecidual e a patogênese da artrite reumatoide (Jakus *et al.*, 2009; Borregaard, 2010; Kelkka *et al.*, 2014; Hahn *et al.*, 2016).

Os FcγR e CR desempenham papel importante nesse processo, já que esse local possui deposição de imunocomplexos (IC) aderidos ao tecido articular (Luerman *et al.*, 2010; Segel *et al.*, 2011; Day e Link, 2012; Mayadas *et al.*, 2014). Dessa forma, os neutrófilos não conseguem finalizar o processo de fagocitose dos mesmos e então ocorre um evento denominado “fagocitose frustrada” (Cascao *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2014; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015). Tal processo, culmina com participação ativa das enzimas NADPH oxidase e MPO na contribuição do estresse oxidativo e ainda, eventos subsequentes como a desgranulação de enzimas proteolíticas ou a liberação de conteúdo nuclear (NETs) para o meio extracelular, lesionando a cartilagem local e tecidos adjacentes, e contribuindo para o recrutamento e ativação de outras células, bem como para a formação de auto-anticorpos e a perpetuação da doença (Kobayashi e DeLeo, 2009; Boer *et al.*, 2010; Amulic *et al.*, 2012; Nemeth e Mocsai, 2012; Kolaczowska e Kubes, 2013; Pruchniak *et al.*, 2013;

Bardoel *et al.*, 2014; Kovacs *et al.*, 2014; Mayadas *et al.*, 2014; Paiva e Bozza, 2014; Wright *et al.*, 2014).

Neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR, com estágio de doença ativa, também são mais polarizados, produzindo elevados níveis de ERO, desgranulando com facilidade e respondendo mais facilmente à IC, em comparação à neutrófilos de indivíduos saudáveis (Fairhurst *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2010; Kundu *et al.*, 2012). Pacientes com AR ativa, submetidos a monoterapia de metotrexato (MTX), possuem neutrófilos periféricos com aumentos do “burst” oxidativo e da expressão de receptores Fc $\gamma$  e CR, além da presença de fatores quimiotáticos no soro e aumento simultâneo da migração para a sinóvia inflamada (Cascao *et al.*, 2009; Cascao *et al.*, 2010; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2011).

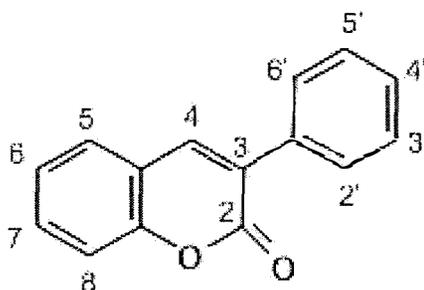
O tratamento medicamentoso atual da AR é baseado no uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs, da sigla em inglês), corticosteróides, drogas anti-reumáticas como o metotrexato (MTX) que são capazes de modificar o curso da doença (DMARDs, da sigla em inglês) e que devem ser indicadas nos três a seis primeiros meses, para todo paciente com diagnóstico estabelecido de AR. E por último, os agentes biológicos antagonistas anti-TNF e anti-IL-6 (O'shea *et al.*, 2013; Pomirleanu *et al.*, 2013; Shaffu *et al.*, 2013). Essas drogas podem oferecer ao paciente o alívio dos sintomas, a prevenção da progressão das lesões e a melhora da função das articulações pelo bloqueio da ação ou produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose de linfócitos T (Kundu *et al.*, 2011; Selmi *et al.*, 2014; Wang e Arase, 2014). Contudo, a terapêutica atual não reduz a migração e a ativação exacerbada de neutrófilos, e ainda possuem vários efeitos adversos aos pacientes, levando a não aderência e descontinuidade do tratamento (Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

Como o arsenal citotóxico liberado pelos neutrófilos não são específicos, a estratégia de modulação da produção de ERO, liberação de grânulos e de NETs por essas células, são um alvo terapêutico para a diminuição da resposta inflamatória e lesão tecidual encontrada na artrite (Liao *et al.*, 2015). Dessa forma, (Hagfors *et al.*, 2003), o emprego de substâncias capazes de modular essas funções efetoras dos neutrófilos é visto como adjuvante terapêutico (Kirchner *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Vorobjeva e Pinegin, 2016). Considerando este aspecto, novas terapias para AR têm sido buscadas, havendo um grande interesse farmacêutico em princípios ativos de origem vegetal como terapia complementar ou adjuvante ao tratamento convencional, a fim de reduzir as dosagens utilizadas por esses medicamentos e sobretudo

prevenir os danos aos tecidos adjacentes pelo acúmulo de IC e resposta inadequada dos neutrófilos (Phillips *et al.*, 2010; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

### 1.8. Derivados 3-fenilcumarínicos

Os derivados 3-fenilcumarínicos são um grupo de metabólitos secundários, encontrados em plantas e alguns microorganismos e são conhecidos também por aril-3-cumarinas ou 3-arilcumarinas, possuem o núcleo básico das cumarinas, porém, são classificados como uma subclasse de isoflavonóides (Zuanazzi e Montanha, 2004) (Figura 1.1.).



**Figura 1.1.** Núcleo fundamental dos derivados 3-fenilcumarínicos (Zuanazzi; Montanha, 2004).

Esses compostos possuem diversas atividades biológicas como antioxidante (Roussaki *et al.*, 2010), inibindo o metabolismo oxidativo de neutrófilos (Kabeya *et al.*, 2006; Kabeya *et al.*, 2008), antidepressiva (Sashidhara *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2013; Sashidhara *et al.*, 2014), anticoagulante (Tunali *et al.*, 2004), antiagregante plaquetária (Tawata *et al.*, 1990), antibacteriana (Nkengfack *et al.*, 2000), inibidora da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (De Marchi *et al.*, 2004), inibidora da replicação viral (Olmedo *et al.*, 2012), inibidora de esteróide-sulfatases (Demkowicz *et al.*, 2016), inibidora da enzima monoamina oxidase B (Matos *et al.*, 2011; Ferino *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2013), inibidora da enzima lipoxigenase (Roussaki *et al.*, 2010), inibidora da fosforilação da enzima PKC (Drabikova *et al.*, 2013), inibidora da desgranulação de mastócitos (Santos *et al.*, 2013) e forte atividade “scavenger” de radicais de oxigênio (Roussaki *et al.*, 2010; Svinyarov e Bogdanov, 2014).

Andrade e colaboradores (2013) avaliaram o efeito antioxidante de uma série de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos. Dentre o conjunto de substâncias, o derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, denominado de C13, foi o mais efetivo em inibir a quimioluminescência em virtude de sua capacidade de atuar como “scavenger” de radicais de oxigênio. Dando continuidade a esses estudos, Andrade M. F., 2016, avaliou a atividade *in vitro* da C13 em diversas funções efetoras de neutrófilos de indivíduos saudáveis, observando que a mesma, além de possuir atividade “scavenger” de ERO, atua na modulação negativa do metabolismo oxidativo também por interagir com o sítio ativo da MPO. Além disso, ela interfere na desgranulação da elastase e no processo de formação e liberação de NETs de neutrófilos periféricos de indivíduos saudáveis.

### **1.9. Incorporação de compostos fenólicos em lipossomas**

Os compostos fenólicos têm apresentado várias atividades interessantes para serem aplicados no tratamento de doenças, onde há a participação efetiva dos neutrófilos (Pietta, 2000). No entanto, esses compostos apresentam baixa solubilidade em água, como também podem sofrer metabolização e, portanto, podem não promover seu efeito quando utilizados *in vivo*. A fim de evitar esses problemas, essas substâncias podem ser incorporadas em vesículas carreadoras capazes de entregá-las mais facilmente no alvo de interesse. Existem diversas estruturas, de forma e composição diferentes, que promovem tais benefícios e que têm sido utilizadas na incorporação de fármacos convencionais para o tratamento de várias doenças, especialmente o câncer (Ajazuddin e Saraf, 2010; Allen e Cullis, 2013).

Os lipossomas formam um grupo desses carreadores, pois são construídos com base em produtos biocompatíveis, que não apresentam toxicidade para as células (Gharib *et al.*, 2015). Existem diversos tipos de lipossomas que podem variar de acordo com o tamanho e o número de camadas de membrana lipídicas (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Pattni *et al.*, 2015). O uso desses carreadores possuem vantagens como, alta biocompatibilidade (pois são veículos biodegradáveis e não tóxicos), facilidade de preparo, versatilidade química (permitindo o carregamento de compostos hidrofílicos, anfifílicos e lipofílicos), aumento da solubilidade e biodisponibilidade da droga, proteção contra toxicidade (pois reduz a exposição do fármaco aos demais tecidos), aumento da atividade farmacológica (por direcionar o tempo de permanência

do fármaco no local de lesão), além de promover a estabilidade físico-química da substância incorporada (Edwards *et al.*, 2007; Ajazuddin e Saraf, 2010; Kapoor *et al.*, 2014).

A incorporação de superóxido dismutase (SOD), principalmente, mas também de outras substâncias, em lipossomas de variadas composições tem sido investigada por diversos grupos, em diferentes modelos animais, na tentativa de atenuar ou eliminar os efeitos em diferentes doenças inflamatórias, inclusive a AR. Os resultados têm se mostrado positivos tanto na diminuição do número de leucócitos infiltrados, como na diminuição de citocinas inflamatórias, na proteção da articulação ou inibindo o desenvolvimento de artrites induzidas em animais (Corvo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Simoes *et al.*, 2005).

Em relação ao tratamento da artrite, estudos mostraram que, em virtude de seu tamanho e composição química, os lipossomas têm se mostrado muito eficazes para reter o fármaco no interior da cavidade sinovial, podendo aumentar seu tempo de permanência na sinóvia em mais de 40 horas (Edwards *et al.*, 2007; Kapoor *et al.*, 2014).

Considerando os efeitos biológicos que o derivado 3-fenilcumarínico (C13) possui sobre funções efetoras dos neutrófilos e que essas células participam da patologia de doenças autoimunes, que envolvem a deposição de imunocomplexos, pesquisas utilizando essa substância são interessantes e necessárias. Nesse sentido, estudos *in vitro*, a fim de verificar os efeitos da C13 nas funções efetoras de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, auxiliarão no entendimento dos mecanismos de ação dessa substância, permitindo que a mesma possa servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação terapêutica nessas doenças.

## **II. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos antioxidante e anti-inflamatório do Derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13), na forma livre e/ou incorporada em lipossomas, sobre as funções efetoras de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com Artrite Reumatoide (AR), estimulados via receptores FcγR e/ou CR.

Para atingir este objetivo, foi desenvolvida a seguinte abordagem experimental:

- Obtenção, purificação e caracterização da IgG anti-OVA;
- Incorporação do derivado 3-fenilcumarínico em sistemas carreadores tipo lipossomas e caracterização físico-química das vesículas formadas;
- Avaliação *in vitro* do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, na forma livre e/ou incorporada em lipossomas, no metabolismo oxidativo de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa estimulados via receptores FcγR ou FcγR +CR, por meio dos ensaios de quimioluminescência dependente de luminol;
- Avaliação *in vitro* do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, na forma livre, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa estimulados via CR, por meio da mensuração da oxidação do TMB;
- Avaliação *in vitro* do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, na forma livre e/ou incorporada em lipossomas, sobre a desgranulação de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa estimulados com Imunocomplexos Imobilizados (iIC), por meio da mensuração da atividade da enzima elastase;
- Avaliação *in vitro* do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, na forma livre, sobre a formação e liberação das Redes extracelulares (NETs, da sigla em inglês) de neutrófilos, de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa, estimulados com iIC, por meio de Microscopia de Fluorescência e Picogreen®;
- Investigação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico na viabilidade celular de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa, mantidos em cultura, por meio: da análise de exclusão ao corante Azul de Tripan, da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), do índice de apoptose (Anexina-V) e necrose

(Iodeto de propídio), da fragmentação do DNA (Hipodiploidia) e da expressão de receptores relacionados à ativação celular (CD64 e CD62L).

### **III. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **3.1. Sujeitos da Pesquisa**

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizado sangue periférico de pacientes do sexo feminino com artrite reumatoide, diagnosticados conforme os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (Arnett *et al.*, 1988), provenientes do Ambulatório de Doenças Reumáticas do Centro de Reabilitação (CER) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). Foram avaliadas um total de 84 pacientes do sexo feminino, faixa etária entre 33 e 82 anos, em tratamento com metotrexato (10 – 20mg/ semana) e prednisolona (5 – 20mg/dia), classificadas em AR ativa ou AR inativa através do cálculo de índice de atividade da doença (DAS-28), baseado na escala: 0,0 – 3,2 (baixa à moderada atividade, AR inativa); 3,3 – 10,0 (alta atividade, AR ativa). Foram também 32 mulheres saudáveis, recrutadas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), comparadas as pacientes em termos de sexo, idade, perfil imunogênico e sem uso de medicamentos.

Para cada experimento foi utilizado um N amostral obtido por cálculos estatísticos e adequado em estudos sobre fisiopatologia de doenças por imunocomplexos como a artrite reumatoide e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; Russo-Carbolante *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008) realizado em nosso grupo de pesquisa.

### **3.2. Obtenção de material biológico**

Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa na região da fossa cubital por profissional capacitado, utilizando sistema a vácuo estéril e descartável, sem anticoagulante. Foram colhidos 25 ml de sangue de cada indivíduo para a realização deste estudo.

### **3.3. Aspectos éticos**

Para o desenvolvimento deste trabalho, as pacientes foram conscientizadas dos objetivos do trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da coleta do material biológico. A realização desse procedimento seguiu as recomendações da resolução 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HC-FMRP-USP (Protocolo de pesquisa CEP/HCRP nº 15038/2015 com data 11/12/2015, anexo 1). A Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), como

instituição coparticipante, esteve ciente do recrutamento de voluntárias saudáveis para participação na pesquisa, e as mesmas foram conscientizadas dos objetivos do trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da colheita de sangue (Instituição proponente FCFRP, 24/03/16, anexo 2).

### **3.4. Obtenção do soro humano normal (SHN) e soro humano de artrite (SHAr)**

O sangue colhido foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 1 hora, para retração do coágulo formado, e posteriormente centrifugado (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Alemanha) à 805 x g por 10 minutos, 20°C. O soro obtido foi armazenado à -80 °C para utilização na opsonização dos estímulos.

### **3.5. Obtenção de leucócitos polimorfonucleares humanos - Neutrófilos**

Os neutrófilos foram purificados a partir do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com AR e misturado com volume igual de anticoagulante (Alséver pH 6,1). O método de separação dos neutrófilos utilizado foi o da gelatina, descrito por (Henson, 1971), modificado por (Lucisano e Mantovani, 1984). O sangue contido no tubo com anticoagulante foi centrifugado (1258g, 10 minutos, 25 °C, sem aceleração e sem desaceleração) e o plasma e a camada de células mononucleares foram removidos. O sedimento foi suspenso em uma solução de gelatina a 2,5% em NaCl 0,15 mol/L, e incubado em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante contendo neutrófilos foi diluído em igual volume de NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (974g, por 10 minutos, 25 °C, 5 de aceleração, 5 de desaceleração). As hemácias remanescentes foram lisadas com NH<sub>4</sub>Cl 0,83% (pH 7,2) incubadas a 37 °C por 5 minutos. As células foram centrifugadas e o sedimento lavado com NaCl 0,15 mol/L, centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores, e em seguida suspensas em solução de Hanks (pH 7,2) contendo 0,1% de gelatina, nas concentrações requeridas para cada experimento, e mantidos em banho de gelo até o momento do uso.

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com líquido de Turk na diluição de 1:100, e a viabilidade foi analisada por meio da exclusão do corante azul de Tripan. As preparações de neutrófilos obtidas por este método de purificação apresentaram cerca de 80% de pureza e 97% de viabilidade, mostrado anteriormente por (Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2014).

### **3.6. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos**

#### **3.6.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA**

Para a obtenção dos anticorpos foram utilizados quatro coelhos da espécie Nova Zelândia, fêmeas, jovens e de aproximadamente 2,5 kg, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os procedimentos experimentais realizados nesses animais seguiram os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo (CEUA FCFRP) na data de 12/04/2016, (protocolo de pesquisa nº 15.1.1163.60.0, anexo 3).

As coelhas foram imunizadas com solução de antígeno (albumina de ovo de galinha – OVA, Sigma, St. Louis, Estados Unidos da América) preparada a 5 mg/mL em NaCl a 0,15 mol/L, e emulsionada em adjuvante completo de Freud (1:2). A emulsão foi administrada por via subcutânea no dorso do animal, sendo que cada animal recebeu quatro injeções de 0,5 mL, totalizando 5 mg de OVA por animal. Após 30 dias, os mesmos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e ketamina (35 mg/kg) para colheita do sangue por punção cardíaca, sendo os animais eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> imediatamente após o término do procedimento.

O sangue ficou em repouso por 1 hora em temperatura ambiente (25°C) para retração e desprendimento do coágulo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado (755g por 15 minutos a 4°C). O soro obtido foi mantido em banho-maria (30 minutos, 56°C), para inativação dos componentes do sistema complemento. Após o resfriamento, o soro dos diferentes animais foi reunido em um “pool” e armazenado em freezer a -20°C.

#### **3.6.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA**

A IgG total foi purificada a partir do soro imune, utilizando a metodologia descrita por (Fahey *et al.*, 1964), modificada por (Lucisano e Mantovani, 1984). Inicialmente, a fração proteica contendo IgG foi precipitada pela adição de solução saturada de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao soro imune total, em quantidade suficiente para que a mistura atingisse 40% de saturação. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas a 4°C, e depois foi centrifugada (1800g, 15 minutos, 25°C). O precipitado foi lavado com solução de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 40% (m/v), centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores, dissolvido em PBS pH 7,4 e

dialisado contra solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) a 4°C por 48 h, sendo realizado trocas do tampão a cada 12 horas.

Após essa etapa, empregou-se a técnica de cromatografia de troca iônica para purificar a IgG contida na amostra dialisada. Para isso, foi utilizada a resina dietilaminoetil (DEAE)-celulose como fase estacionária e solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) como fase móvel. O efluente da coluna foi recolhido e a eluição das frações foi monitorada através da leitura de absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão). Quando o pico I, que contém a IgG total, foi eluído, a fase móvel foi acrescida de solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) suplementada com 1 mol/L de NaCl para eluir as demais proteínas presentes na amostra, formando o pico II. As frações cromatográficas correspondentes ao primeiro pico de proteínas foram reunidas e concentradas por filtração em sistema Amicon®, utilizando membrana de celulose com limite de exclusão de 100 kDa. Enquanto que as proteínas correspondentes ao pico II foram descartadas. Por último a amostra concentrada foi dialisada contra PBS pH 7,4 por 24 horas a 4 °C e armazenadas a -20°C até o uso.

### **3.6.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA**

Para analisar se a preparação de IgG estava pura, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970). Para isso, um gel de empilhamento a 4% e um gel de corrida a 10%, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 mol/l pH 6,8 e Tris-HCl 1,5 mol/l pH 8,8, respectivamente, foi montado no suporte de eletroforese. Na sequência foram adicionados a solução de acrilamida a 30% (m/v) e o catalisador tetrametilenodiamino (TEMED) a 10% (m/v), foram utilizados.

As amostras de IgG e os padrões de proteína de alta densidade foram diluídos (na proporção 1:10 e 1:2, respectivamente), em uma mistura constituída de tampão Tris 0,06 mol/L pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol. A análise eletroforética foi realizada em temperatura ambiente (25°C) sob corrente elétrica contínua de 10 mA, utilizando-se o tampão Tris-glicina pH 8,3 como fase móvel. O tempo de análise foi determinado acompanhando-se a migração do corante azul de bromofenol.

A massa molecular das amostras de IgG foram calculadas conforme sugerido por Johnstone e Thorpe (1987), através da curva de regressão linear do logaritmo da massa molecular em função do fator de retenção ( $R_F$ ) de cada proteína do padrão de massa molecular.

### **3.6.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo**

No intuito de avaliar a habilidade da IgG em reagir com o antígeno, bem como as quantidades relativas de IgG e OVA necessárias para formação de imunocomplexo, foi realizada uma imunodifusão radial dupla de acordo com o método (Ouchterlony, 1958). Para isso, uma camada de agar fundido (preparado a 1,3% em PBS pH 7,4) sobre uma lâmina de vidro foi depositada e, após solidificação, poços nos quais foram adicionadas amostras de OVA (1 mg/ml) e de IgG, diluídas de forma seriada foram perfurados. Após 48 h em temperatura ambiente (25°C), o gel foi lavado, seco em estufa a 37°C e corado com Coomassie Brillant Blue “G”. Após lavagem com solução descolorante (metanol: ácido acético: água 10:15:75), foi possível analisar, de modo qualitativo, a zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo em questão.

A análise desta lâmina mostrou a provável proporção de antígeno e anticorpo do ponto de equivalência. A partir daí, foi construída a curva de precipitação para determinação quantitativa do ponto de equivalência. Para isso, alíquotas do anticorpo foram diluídas 1:2 em PBS e a solução do antígeno (OVA, 1 mg/mL) foi diluída em PBS nas seguintes proporções: s/d, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Em seguida, volumes iguais de antígeno e anticorpo foram misturados, e a reação foi incubada (1 hora, 37°C) e depois mantida em refrigeração (12 horas, 4°C) para formação dos IC.

As suspensões formadas foram centrifugadas (7200g, 15 minutos, 25°C), lavadas por duas vezes e suspensas em NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em NaOH 0,1 mol/L e diluída em NaCl 0,15 mol/L, para leitura de absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm.

## **3.7. Preparação dos estímulos**

### **3.7.1. Preparação de Imunocomplexos (IC)**

Para avaliação das funções efetoras dos neutrófilos, foram preparados imunocomplexos (IC) precipitados e imobilizados formados de IgG anti OVA e o antígeno OVA. Foram preparados também IC precipitados formados de IgG-OVA opsonizados com proteínas do sistema complemento presentes no soro das mulheres saudáveis ou das pacientes com AR, denominados IgG-OVA/SHN e IgG-OVA/SHAr.

### **3.7.2. Preparação de Imunocomplexos precipitados**

Os IC foram preparados adicionando-se o antígeno (OVA) sobre o anticorpo (IgG) nas proporções estabelecidas pelo ponto de equivalência. A mistura antígeno-anticorpo foi incubada por 1 hora a 37°C. O IC precipitado foi armazenado overnight, a 4°C, formando uma malha IC precipitado. O precipitado foi centrifugado a 12000g por 10 minutos a 4°C, lavado por 2 vezes com PBS pH 7,4 gelado e suspenso em 1 mL de PBS pH 7,4. Aliquotas de 50 µL da suspensão foi misturada com igual volume de NaOH 0,1 mol/L e o volume completado para 1 ml com PBS, para quantificação de proteínas através da leitura de absorbância em 280nm.

### **3.7.3. Preparação de Imunocomplexos Imobilizados (iIC)**

IC imobilizados (iIC) foram preparados conforme metodologia de (Jakus *et al.*, 2009). O método seguiu a proporção antígeno e anticorpos estabelecida na zona de equivalência (antígeno 1:2 e anticorpo 1:2). Para isso, uma solução de 1 mg/mL de Ovoalbumina (OVA) diluída 1:2 em tampão carbonato/bicarbonato (0,5 mol/L, pH 9,6), foi adicionada aos poços. A placa foi mantida por 16 horas na geladeira. Na sequência, os poços foram lavados três vezes com PBS, pH7,4 contendo Tween 20 a 0,05% (PBST), bloqueados para ligação inespecífica com uma solução de PBS com 2% de albumina de soro bovino (BSA, da sigla em inglês) por 1 hora.

Para formar os IC, foi adicionado IgG anti-OVA (1:2 em PBS) aos poços e mantido por 90 minutos. Após esse período os poços foram lavados três vezes com PBST e a placa foi armazenada na geladeira até o momento do uso. As placas utilizadas foram: de 96 poços próprias para leitura de quimiluminescência e placas de 96 poços (Immulon 2HB<sup>®</sup>) próprias para leitura em espectrofotometria.

### **3.7.4. Opsonização de Imunocomplexos precipitados**

Os IC preparados IC-IgG-OVA foram centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi suspenso em SHN ou SHAr, previamente diluído 1:2 em CFD (Tampão Diluente para Fixação de Complemento) descrito por Weir (1986), na proporção de 1µL de soro para cada 1µg de IC. Após 30 minutos de incubação em banho-maria a 37 °C, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições, o sedimento foi suspenso em PBS na concentração de 1µg/µL e mantidos em banho de gelo até o momento do uso. Os ICs opsonizados foram

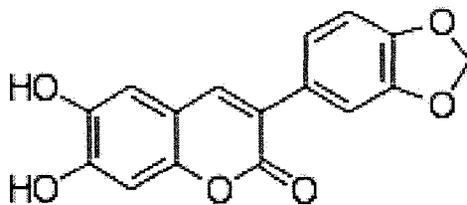
denominados IgG-OVA/SHN e IgG-OVA/SHAr sendo utilizados como agonistas dos receptores FcγR e CR.

### **3.7.5. Preparação Zimosan opsonizado (ZIops)**

Zimosan (ZI) é uma preparação insolúvel em meio aquoso, formada de resíduos de polissacarídeos da parede celular de levedura que, em contato com o soro, ativa o sistema complemento, produzindo partículas revestidas (opsonizadas). Nesta forma, estas partículas são reconhecidas por receptores presentes na membrana dos neutrófilos, facilitando o processo de fagocitose (Woeber e Ingbar, 1973). Uma suspensão de ZI (3 mg/mL) em solução fisiológica (NaCl 0,9%) foi mantida em banho fervente (100 °C) durante 30 minutos, sendo depois centrifugada a 270g por 5 minutos. Para cada mg de ZI adicionou-se 0,1 mL de Soro Humano Normal (SHN) diluído 1:2 em CFD (Tampão Diluente para Fixação de Complemento). Após incubação em banho-maria a 37°C durante 30 minutos obteve-se o zimosan opsonizado (ZIops). A suspensão foi centrifugada a 480 g por 5 minutos e o sedimento formado foi lavado com solução fisiológica nas mesmas condições. A concentração da suspensão de ZIops foi ajustada, de acordo com o ensaio requerido com solução de Hanks-Taurina (5mM).

### **3.8. Síntese do derivado 3-fenilcumarínico utilizado no estudo**

O derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilendioxiifenil]-cumarína (C13) (Figura 3.1.) foi sintetizado com a colaboração dos grupos de pesquisa da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo e do Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). A substância foi sintetizada através da reação de Perkin-Oglialoro, onde derivados do ácido fenilacético (Aldrich) reagem com derivados do salicilaldeído (Aldrich), ambos apropriadamente substituídos, em meio contendo anidrido acético e acetato de potássio (De Marchi *et al.*, 2004; Kabeya *et al.*, 2007; Matos *et al.*, 2011). O derivado 3-fenilcumarínico foi purificado por recristalização, avaliado quanto à pureza por cromatografia em camada delgada e caracterizado pela determinação do ponto de fusão. A amostra apresentou um grau de pureza adequado (99%) para ser utilizada nos ensaios subsequentes. A estrutura química foi elucidada por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, bem como por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*.



**Figura 3.1.** Estrutura química de 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13).

### 3.9. Preparo de lipossomas e caracterização físico-química dos LUV

Neste estudo, vesículas lipossomais unilamelares (LUV, da sigla em inglês) foram empregadas utilizando o método descrito por (Batzri e Korin, 1975), modificado por (Oliveira *et al.*, 2005), por possuir algumas vantagens uma vez que é muito simples, de baixo custo e produz preparações lipossomais razoavelmente homogêneas, como revelado pelas técnicas de determinação de tamanho. Além disto, pode ser aplicado para produção de vesículas em larga escala. Tal ferramenta, constituiu-se em uma injeção controlada (1-3 $\mu$ L/s) de uma solução etanólica de lipídeos contendo fosfatidilcolina hidrogenada de soja e colesterol na proporção de massa de 5:1 (PC:CHOL) usando uma seringa de 1 mL de insulina em excesso de solução aquosa de NaCl a 0,9% sob agitação e a temperatura de 55 a 59°C, acima da temperatura de transição de fase do fosfolípido empregado. Os lipossomas livres obtidos foram purificados por ultracentrifugação a 40.000g por 2h a 4°C, e a C13 não encapsulada foi removida.

A caracterização físico-química dos nanocarreadores, foi realizada pelo método de espectroscopia de correlação de fótons. Na proporção dos lipossomas 1:10 foi determinado o tamanho da partícula, o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta através de medidas de espalhamento de luz em Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK).

Para determinação da eficiência de incorporação da substância em estudo, foi obtido o espectro de varredura no UV-visível no comprimento de onda de 375 nm da mesma em etanol. Após o preparo, os LUV foram rompidos com álcool etílico absoluto na proporção 1:4 e a concentração da C13 encapsulada foi determinada com base na medida da absorbância em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda específico determinado para a C13 (375 nm).

### **3.10. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via receptores FcγR ou FcγR+CR**

O metabolismo oxidativo de neutrófilos de mulheres saudáveis e de pacientes com AR, estimulados por IC precipitados formados de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr e IC imobilizado formado de IgG-OVA, foi avaliado através da medida da produção total de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por QL dependente de luminol (QLlum), conforme metodologia adaptada de LUCISANO-VALIM et al. (2002).

Em placas de 96 poços, foram adicionados os neutrófilos ( $1 \times 10^6$  mL), o derivado 3-fenilcumarínicos nas formas, livre ou incorporada em lipossomas, na concentração de  $CI_{50}$  (concentração da amostra capaz de inibir 50% da QL), descrita por Andrade et al. (2013), ou o controle solvente (DMSO; 0,15%), e a sonda quimioluminescente luminol (100  $\mu$ mol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foi adicionado os diferentes IC precipitados [IgG-OVA ou IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr (60  $\mu$ g/mL)] a cada poço para estimular as células ou Hanks com gelatina 0,1% (controle sem estímulo - espontâneo) e, imediatamente, foi medida a QL em c. p. m. (fótons contado por minuto), durante 15 minutos a 37°C em luminômetro de microplacas (Centro LB 960-Berthold Technologies). Nos ensaios, onde os neutrófilos foram estimulados por IC imobilizado em placa, o experimento difere no tempo de medida da QL, que foi de 30 minutos. Os IC preparados formados de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr e IgG-OVA imobilizado foram preparadas conforme os itens 3.7.2, 3.7.4 e 3.7.3 respectivamente.

O método utilizado, de quimioluminescência amplificada pelo luminol (QLlum), baseia-se na oxidação do luminol pelas EROs produzidas pelos neutrófilos estimulados. A sonda oxidada gera um produto eletronicamente excitado que, ao retornar ao seu estado fundamental, emite fótons de luz, denominada quimioluminescência (QL). A intensidade da QLlum é proporcional à quantidade de EROs produzida (Van e Castranova, 1987).

Através dos perfis cinéticos de QLlum em função do tempo foram calculados os valores de área integrada de 0 a 15 ou de 0 a 30 minutos. Tais valores foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição promovida pela concentração da C13 em relação ao respectivo controle, através da fórmula:

$$\% \text{ inibição da QL} = 100 - \frac{\text{Área integrada da C13} \times 100}{\text{Área integrada do respectivo controle (DMSO 0,1\%)}}$$

O efeito da C13 sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC precipitado, foi avaliado em neutrófilos de sangue periférico de 19 pacientes AR ativa, 17 pacientes AR inativa e 30 indivíduos saudáveis. Já quando as células foram estimuladas com IC imobilizado, foram avaliados neutrófilos de sangue periférico de 9 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 10 indivíduos saudáveis controles, todos realizados em duplicatas.

### **3.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via CR**

A avaliação da atividade da MPO, foi realizada através da quantificação do produto (HOCl) formado pela interação da mieloperoxidase com o seu substrato, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para isso em tubos de fundo redondo, neutrófilos (4x10<sup>6</sup> cel/mL) incubados com Hank's suplementado com taurina (5 mM), foram tratados com C13 na forma livre (20 uM). A reação foi iniciada com a adição do estímulo Ziops (3 mg/mL) em um volume final de 500 µL. . O estímulo utilizado formado de Zimosan opsonizado (Ziops) foi preparado conforme o item 3.7.5. As amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C e sob agitação leve, posteriormente, foi adicionada catalase (2 mg/mL) para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados 1620g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram separados e mantidos em banho de gelo. A quantificação da reação foi realizada adicionando-se em placa de 96 poços o sobrenadante da reação juntamente com a solução reveladora contendo TMB (20 mM) e, após 5 minutos, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro em 630 nm (Epoch 2-Biotek Instruments, Estados Unidos).

Com os valores de absorvância (630 nm) referentes à oxidação do TMB de cada amostra foram calculadas as porcentagens de inibição em relação ao controle positivo (100% de oxidação do TMB). Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição da oxidação TMB} = 100 - \frac{\text{Absorvância da amostra} \times 100}{\text{Absorvância do controle negativo}}$$

O efeito da C13 sobre a atividade da MPO, foi realizado com neutrófilos de sangue periférico de 8 pacientes AR ativa, 8 pacientes AR inativa e 8 indivíduos saudáveis, realizados em triplicata.

### **3.12. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o processo de desgranulação de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FC $\gamma$ R**

Descrito por (Johansson *et al.*, 2002) e modificado por (Kanashiro *et al.*, 2004) este ensaio avalia a atividade catalítica da enzima elastase utilizando o substrato incolor succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida (SAAVNA) que na presença desta enzima é degradado no produto de coloração amarela, p-nitroanilina (p-NA), o qual passa a ser quantificado espectrofotometricamente a 405 nm. Para isso, em tubos de fundo redondo, neutrófilos ( $4 \times 10^6$  mL) foram incubadas (37°C, 30 min) com C13 na forma livre (20  $\mu$ mol) ou encapsulada em lipossomas (20  $\mu$ mol), controle solvente (DMSO 0,1%) ou solução de HBSS com gelatina a 0,1% (controle positivo). Posteriormente, as células incubadas com os referidos tratamentos, foram transferidas para placas de 96 poços que possuíam uma camada de imunocomplexos imobilizados, formados de IgG-OVA, e incubadas (30 min a 37°C). Após incubação a placa foi centrifugada (700g, 10 minutos, 4°C), e o sobrenadante colhido. Ao sobrenadante foi adicionado o substrato SAAVNA (1 mM). Foi realizada leitura espectrofotométrica em 405 nm (Epoch 2-Biotek Instruments, Estados Unidos) após 30 minutos para verificar a formação de p-NA durante este período. O sistema foi mantido a 37°C. Como controle negativo, foi medida a atividade da enzima liberada na ausência de estímulo (apenas células e tampão). Para corrigir possíveis interferências da substância estudada nas leituras, foram feitos “brancos” contendo o derivado 3-fenilcumarínico na concentração avaliada juntamente com os demais compostos da reação exceto o substrato SAAVNA, o qual foi substituído pelo seu solvente (DMSO). Os valores de absorvância obtido nestes poços foram subtraídos dos valores de absorvância das respectivas amostras. As placas com IC imobilizados foram preparadas conforme o item 3.7.3. O efeito da C13 sobre a liberação da enzima elastase foi averiguado em neutrófilos de sangue periférico de 09 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 5 controles, realizados em duplicatas.

### **3.13. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o processo de formação de Redes extracelulares de Neutrófilos (NETs) de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FC $\gamma$ R**

#### **3.13.1. Análise quantitativa da formação e liberação das NETs**

O ensaio foi realizado de acordo com Behnen et al., 2014, com modificações. Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) foram incubados com C13 na forma livre (20  $\mu$ M), DMSO (0,1% - controle solvente), solução de HBSS ou DPI (1  $\mu$ mol/L – controle negativo), (Palmer *et al.*, 2012) em tubos de fundo redondo, por 15 minutos, 37°C, sob agitação leve. Foi adicionado 1 nM de TNF- $\alpha$  humano (El-Benna *et al.*, 2008) e incubados por mais 15 minutos. Após essa etapa, as células com os referidos tratamentos, foram transferidas para placa de 96 poços (Immulon 2HB<sup>®</sup>), que possuíam uma camada de imunocomplexos imobilizados, formados de IgG-OVA, e mantidos a 37°C, sob agitação leve, por um período de 6 horas. Em um dos poços, o estímulo utilizado foi o PMA  $10^{-7}$  mol/L. Ao final do período de incubação, foi adicionado 0,5 U/mL de DNase (10 minutos, 37°C) para clivar o DNA liberado. A seguir, adicionou-se 10 mmol/L de EDTA para paralisar a atividade da enzima. As amostras foram centrifugadas (300 g, 25 °C por 5 minutos, sem aceleração e sem desaceleração), o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C para posterior quantificação do DNA liberado. O DNA foi quantificado por meio de fluorescência em fluorímetro de placa (Synergy 2-Biotek Instruments, Estados Unidos), com filtro de excitação de 485 nm e de emissão de 527 nm, utilizando-se o Kit Picogreen. As placas com IC imobilizados foram preparadas conforme o item 3.7.3.

O efeito da C13 sobre a formação e liberação de NETs foi realizado em neutrófilos de sangue periférico de 10 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 7 indivíduos saudáveis, com medidas em em duplicata.

#### **3.13.2. Análise qualitativa da formação e liberação das NETs**

Para realização do ensaio, seguiu-se os mesmos passos descritos no item 3.12.1 até o período de incubação de 6 horas. Após essa etapa, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 por 10 minutos e realizado o bloqueio com 3% de BSA por 20 minutos. Para a visualização das NET em microscopia de fluorescência invertido, foi utilizado anticorpo primário específico para a elastase humana (anti-neutrophil elastase antibody ab21595 – Rabbit policlonal IgG). As células foram incubadas

*overnight* com o referido anticorpo, lavada com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L - Alexa Fluor 488). As células foram incubadas também com DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol). As imagens foram obtidas por meio do Microscópio de Fluorescência (Axiovert 40CFL Zeiss). Foram realizados dois experimentos para confirmação do resultado utilizando neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa.

### **3.14. Investigação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em cultura**

#### **3.14.1. Análise do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico pelo método de exclusão ao corante azul de Tripan**

Descrito anteriormente por Andrade et al (2013), em ensaios de exclusão ao corante azul de Tripan e liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), os derivados 3-fenilcumarínico nas concentrações de  $CI_{50}$  (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e máxima concentração avaliada (20  $\mu\text{mol/L}$ ), não interfere na viabilidade celular de neutrófilos de indivíduos saudáveis. Para confirmar esse dado em células de pacientes, foi repetido o teste de viabilidade celular, conforme descrito em (Lucisano-Valim *et al.*, 2002). Dez experimentos (5 pacientes e 5 controles) independentes foram realizados, com medidas em duplicata.

Em tubos de fundo redondo, os neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL), foram incubados com C13 na forma livre nas concentrações de estudo (1 e 20  $\mu\text{mol/L}$ ), Triton X-100 (0,2%; v/v), solvente (DMSO; 0,1%; v/v) ou Hanks, sob condições de cultura em câmara de  $\text{CO}_2$  (5%) 37°C. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (970g, 10 minutos, 4°C), possibilitando a separação entre o sobrenadante e o sedimento de células.

O sedimento foi suspenso em Hank's com gelatina 0,1% e uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume do corante azul de Tripan (0,1% em NaCl 0,15 mol/L), corando células inviáveis. A porcentagem de células viáveis foi avaliada em câmara de Neubauer a partir da contagem de 200 células, em microscópio óptico (modelo BX51, Olympus, Tóquio, Japão) (Freshney, R. I., 1994). Os resultados foram obtidos utilizando-se neutrófilos de sangue periférico de 4 pacientes AR ativa, 6 pacientes AR inativa e 18 indivíduos saudáveis, com medidas em duplicata. O sobrenadante foi analisado quanto à presença da enzima lactato desidrogenase (LDH), descrito a seguir.

### **3.14.2. Análise do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico pelo método de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)**

Sobrenadantes da cultura de neutrófilos, obtido conforme o item anterior, foram analisados quanto à presença da enzima lactato desidrogenase (LDH), pelo emprego do kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil). Ao reagente de trabalho, que é composto de piruvato, NADH e tampão, foi adicionada uma alíquota do sobrenadante, e a absorvância foi mensurada em 340 nm durante 3 minutos a 37°C, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão) (Kabeya *et al.*, 2002). A atividade enzimática da LDH foi calculada conforme instruções do fabricante do kit. Os resultados foram obtidos utilizando-se neutrófilos de sangue periférico de 4 pacientes AR ativa, 6 pacientes AR inativa e 18 indivíduos saudáveis, com medidas em duplicata.

### **3.14.3. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI) em citometria de fluxo**

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, onde foram estabelecidas condições de cultura para neutrófilos humanos e analisadas o efeito modulador de compostos fenólicos sobre a viabilidade dessas células, foi visto que até a máxima concentração testada (20 µmol/L), a C13 não apresenta citotoxicidade para os neutrófilos de indivíduos saudáveis quando mantidos em contato com a mesma por até 12 horas (Carvalho, C. A. 2015). Pensando numa possível aplicação terapêutica dessa substância em processos inflamatórios onde há uma participação efetiva dos neutrófilos, como na AR, foi avaliado a viabilidade dessas células frente ao derivado 3-fenilcumarínico por um período de tempo mais estendido.

Para isso, neutrófilos foram cultivados em contato com C13 por um período de 18 horas e foram analisados o índice de apoptose e necrose. Este ensaio foi realizado de acordo com as recomendações descritas por Kirchner *et al.*, 2012. Em tubos de citometria neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL), foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico nas concentrações de 1 e 20 µmol/L, DMSO 0,1% (controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina durante 18 horas. Para isso as células foram mantidas sob condições de cultura em câmara de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 100 µl do reagente de incubação, contendo o tampão de ligação, a Anexina V-APC e o Iodeto de Propídeo (PI), diluídos em água

milli-Q. Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida foi adicionado o tampão de ligação e feita imediatamente a aquisição das amostras em citômetro de fluxo (Citômetro de Fluxo FACSCanto – Becton Dickinson, CA, EUA). A análise foi realizada com base em 10.000 eventos.

A avaliação do índice de apoptose e necrose, foi realizada em neutrófilos de sangue periférico de 10 pacientes AR ativa, 20 pacientes AR inativa e 20 indivíduos saudáveis, com medidas em duplicata.

#### **3.14.4. Análise da alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos por citometria de fluxo**

A análise da alteração do conteúdo de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por (Nicoletti *et al.*, 1991). Em tubos de citometria, neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL), foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20  $\mu\text{mol/L}$ , DMSO 0,1% (controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram mantidas em cultura por 18h a 37°C em câmara contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão Citrato, contendo Triton X-100 0,1% e PI 50 $\mu\text{g/ml}$ . Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro overnight a 4°C. A aquisição das amostras foi realizada em citometria de fluxo (FACS Canto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise foi realizada com base em 10.000 eventos. A avaliação da alteração do conteúdo de DNA, foi realizada em neutrófilos de sangue periférico de 20 pacientes AR ativa, 20 pacientes AR inativa e 20 controles, com medidas em duplicatas.

#### **3.14.5. Análise da expressão de receptores de membrana CD62L e CD64, relacionados com o nível de ativação celular de neutrófilos**

A expressão dos receptores relacionados com o estágio de ativação dos neutrófilos foi avaliado de acordo com (Nicoletti *et al.*, 1991). Em tubos de citometria, neutrófilos, foram tratados com o derivado 3- fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20  $\mu\text{mol/L}$ , DMSO (0,1% - controle solvente ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram mantidas em cultura, pelos períodos de 0 e 18 horas (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C). Após o período de incubação, as células foram marcadas com anticorpos IgG1-PE anti-CD62L (IgG1 $\kappa$ pa), e anti-CD64 (IgG1 $\kappa$ pa) ou isotipo controle (IgG1 $\kappa$ pa) por 30 minutos, no escuro a 4°C. Em seguida

foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µl de PBS gelado suplementado de 0,05% de SBF e centrifugadas nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e analisadas em citometro de fluxo (FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise foi realizada com base em 10.000 eventos. A avaliação da expressão de receptores, foi realizada em neutrófilos de sangue periférico de (CD64 tempo 0h: 6 pacientes AR ativa, 9 pacientes AR inativa e 6 indivíduos saudáveis; CD64 18h: 6 pacientes AR ativa, 7 pacientes AR inativa e 5 indivíduos saudáveis; CD62L 0h: 6 pacientes AR ativa, 6 pacientes AR inativa e 9 indivíduos saudáveis controles; CD62L 18h: 6 pacientes AR ativa, 7 pacientes AR inativa e 5 indivíduos saudáveis, com medidas em duplicata.

### **3.15. Análise de dados**

Os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism versão 7.0. Foram utilizadas a análise de variância ANOVA two way seguida do método de Tukey para múltiplas comparações, para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, sendo estas consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## **IV. RESULTADOS**

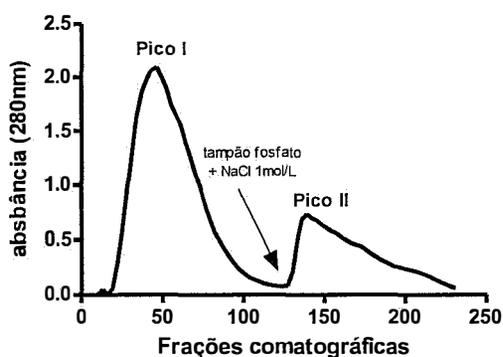
**PARTE I: Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA, Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA e Caracterização Físico-química das vesículas lipossomais utilizadas no estudo**

## 4.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA e caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA

### 4.1.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA

Os anticorpos foram obtidos por meio da imunização de coelhos com OVA. A purificação das frações globulinas do soro desses animais foi realizada em várias etapas, conforme descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

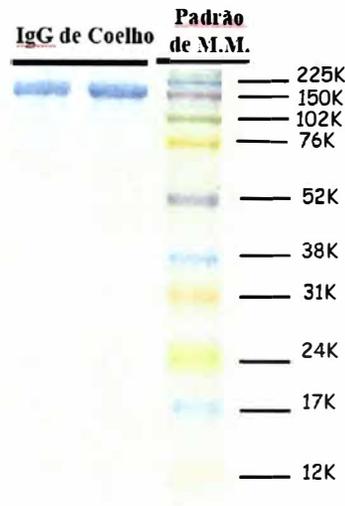
O perfil cromatográfico do soro imune é mostrado na Figura 4.1, onde foram detectados, por meio da leitura de absorvância em 280 nm, dois grupos distintos de proteínas eluídas: o primeiro grupo corresponde às frações de interesse (IgG) e o segundo grupo corresponde às demais proteínas séricas presentes na amostra analisada. As frações cromatográficas de interesse foram reunidas, concentradas e caracterizadas por meio das técnicas de eletroforese e imunodifusão radial dupla, cujos resultados são apresentados abaixo.



**Figura 4.1. Perfil cromatográfico de soro imune rico em IgG anti-OVA, obtido em coluna de DEAE-celulose.** Utilizou-se como fase móvel solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) para eluição do grupo 1 (IgG total) representado pelo pico I, e tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) acrescido de 1 mol/L de NaCl para eluição do grupo 2 (demais proteínas séricas contidas na amostra) representados pelo pico II. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, e o volume de cada fração cromatográfica foi de 5 mL, coletada em temperatura ambiente. **Abreviaturas:** DEAE: dietilaminoetil; IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovoalbumina.

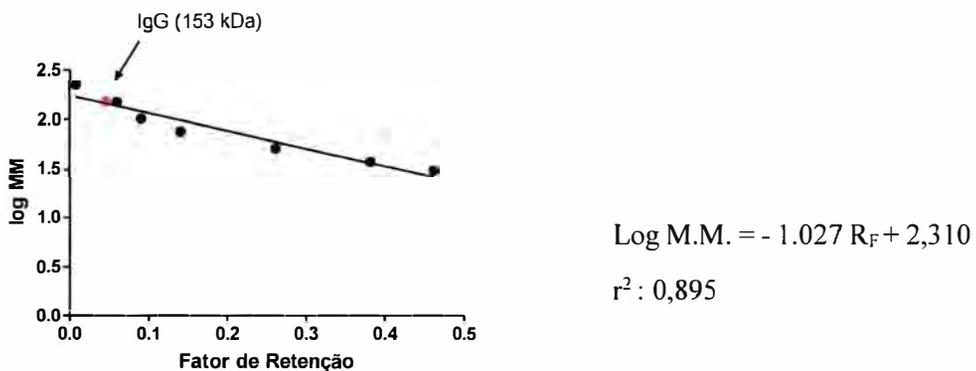
### 4.1.2. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA

Na Figura 4.2, pode ser analisada a significativa homogeneidade na preparação da IgG, visto que por meio da técnica de eletroforese foi encontrada uma banda única e fina no gel, mostrando que as técnicas de purificação empregadas foram efetivas para a obtenção de uma preparação de IgG policlonal com elevado grau de pureza. Podemos observar a banda da amostra da IgG próxima do padrão de peso molecular de 150kDa.



**Figura 4.2. Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA em gel de poliacrilamida com SDS.** Os valores de massa molecular das soluções padrões estão indicados na figura. **Abreviatura:** IgG: Imunoglobulina da classe G; MM: massa molecular; OVA: ovalbumina. SDS: dodecil sulfato de sódio

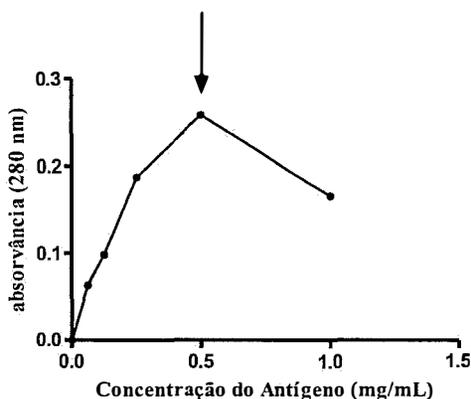
Os valores de logaritmo da massa molecular das proteínas constituintes do padrão de massa molecular foram plotados em função do seu fator de retenção. Após análise dos dados por meio de regressão linear foi obtida a equação da reta, a qual possibilitou o cálculo da massa molecular aparente da IgG purificada, que foi de 153 kDa (Figura 4.3.).



**Figura 4.3. Curva de logaritmo da massa molecular (log MM) em função do fator de retenção ( $R_F$ ) das proteínas separadas por eletroforese.** Por meio da equação da reta de regressão linear foi possível determinar a Massa Molecular aparente da IgG purificada (153 kDa; círculo vermelho indicado pela seta), purificada por cromatografia de troca iônica. **Abreviatura:** IgG: Imunoglobulina da classe G.

### 4.1.3. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo

A habilidade da IgG de reagir com o antígeno (OVA) foi avaliada e percebe-se que a proporção antígeno-anticorpo da zona de equivalência é anticorpo 1:2 e antígeno 1:2. Essa proporção foi mostrada através da determinação quantitativa de imunocomplexos precipitados, utilizando-se anticorpo na diluição 1:2 e OVA em diferentes diluições (Figura 4.4.). Pode ser visto que o maior valor de absorvância e, portanto, a maior concentração de IC precipitados, foi obtido utilizando-se 0,5 mg/mL de OVA, equivalente ao antígeno na diluição 1:2.



**Figura 4.4. Curva de precipitação de imunocomplexos formados de IgG anti-OVA (diluído 1:2) e OVA em diferentes diluições, para determinação quantitativa do ponto de equivalência.** A análise foi feita por meio da determinação da concentração de proteínas pela medida de absorvância em 280 nm. Para isso, alíquotas do anticorpo foram diluídas 1:2 em PBS e a solução do antígeno (OVA, 1 mg/mL) foi diluída em PBS nas proporções: s/d, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada através da medida da absorvância em 280 nm. Foi obtida na proporção de antígeno diluído 1:2 e anticorpo 1:2. A seta indica o ponto de equivalência, onde houve o máximo de precipitação dos IC. **Abreviaturas:** IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovoalbumina.

## 4.2. Caracterização físico-química das vesículas e determinação da eficiência de incorporação do composto fenólico em lipossomas

Podemos observar na tabela 4.1, a caracterização físico-química dos nanocarreadores. A preparação lipossomal encontra-se homogênea quanto ao tamanho e a incorporação da C13 não alterou esse parâmetro. Quanto à carga, eles estão próximos da condição de neutralidade e da mesma forma que a característica anterior, a incorporação da C13 não interferiu nesse aspecto. Já em relação à eficiência de incorporação da C13, foi alcançada uma média de aproximadamente 60%.

**Tabela 4.1.** Caracterização físico-química de lipossomas compostos de PC:CHOL na proporção de massa de 5:1, vazios e contendo a C13, pela determinação do tamanho, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta e Eficiência de Incorporação (EI).

Parâmetros <sup>(a)</sup>	LUV PC:CHOL 5:1	
	Vazio	C13
<b>Tamanho (nm)</b>	119,8 ± 11,80	133,7 ± 18,35
<b>PdI</b>	0,297 ± 0,06	0,392 ± 0,06
<b>Potencial zeta (mV)</b>	-1,69 ± 0,93	-1,22 ± 0,34
<b>EI (%)</b>	—	57,45 ± 7,9

(a) Valores obtidos para os parâmetros de tamanho, PdI e potencial zeta representam a média ± desvio padrão de 17 preparações lipossomais. E valores para EI, representam média ± desvio padrão de 33 preparações de LUV.

**PARTE II: Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, livre e incorporado em vesículas lipossomais, em funções efectoras de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados com diferentes tipos de Imunocomplexos**

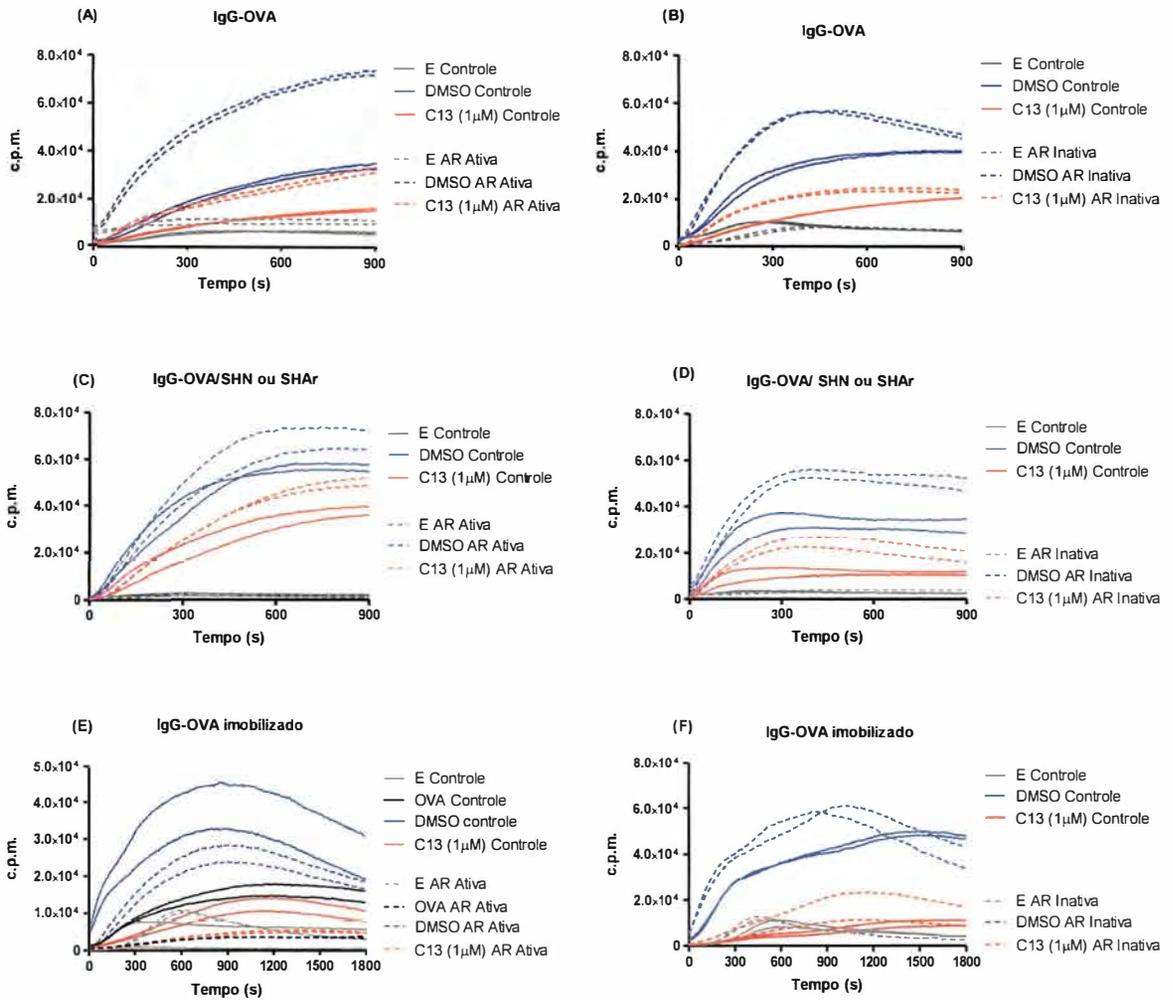
### **4.3. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre as funções efetoras de neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide**

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide em atividade, apresentaram o *burst* oxidativo aumentado em relação à neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, quando estas células foram estimuladas via FcγR e/ou CR (Paoliello-Paschoalato, et. Al., 2011). Mais recentemente, vimos que a C13 modula negativamente o metabolismo oxidativo, a formação e liberação de NETs e a desgranulação de neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis (Andrade, et al., 2013; Andrade, M. F. 2016). Desta forma, visto que neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide em atividade apresentam metabolismo oxidativo exacerbado e que a C13 mostrou atividade antioxidante e anti-inflamatória em neutrófilos saudáveis, propôs estudar o efeito biológico do derivado 3-fenilcumarínico C13 em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide.

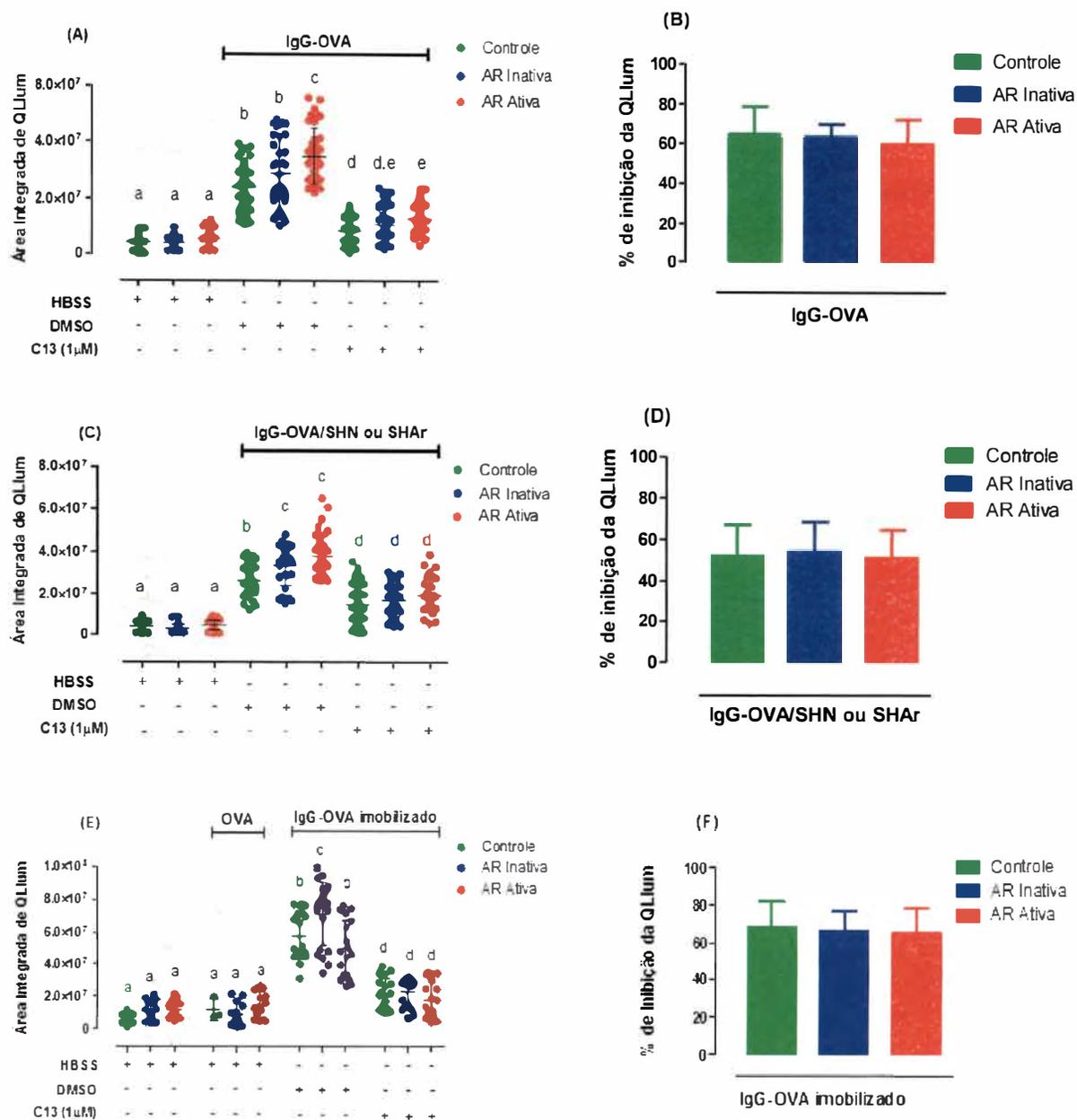
Em todos os experimentos aqui realizados, as concentrações empregadas da C13 não apresentaram efeito tóxico para as células (Andrade, et al., 2013; Andrade, M. F. 2016).

#### **4.3.1. A C13, na forma livre, modula negativamente a produção de ERO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FcγR ou FcγR+CR**

O ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) avaliou a capacidade da C13 em modular as espécies reativas de oxigênio (ERO) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, estimulados via receptores Fcγ ou FcγR+CR, utilizando diferentes tipos de IC precipitados formados de: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, IgG-OVA/SHAR e também IC imobilizado (iIC) formado de IgG-OVA. A figura 4.5 mostra perfis representativos de QLlum, referente a um experimento de pacientes com artrite reumatoide ativa e inativa para os diferentes estímulos. Já a figura 4.6 representa os valores de área integrada e Porcentagem de Inibição referente a QLlum e valores de porcentagem de inibição da C13 nos diferentes estímulos utilizados. Os resultados mostraram que a C13, na concentração de  $CI_{50}$  ( $1\mu M$ ) previamente estabelecida por Andrade et al., 2013, modulou negativamente a produção de ERO dos neutrófilos de pacientes com AR ativa e inativa. Os valores encontrados mostraram que a C13 inibiu a quimioluminescência em aproximadamente 60%.



**Figura 4.5. Perfis cinéticos representativos de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via  $Fc\gamma$  ou  $Fc\gamma R+CR$ .** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (3 min,  $37^\circ C$ ) com C13 ( $1 \mu mol/L$ ), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC precipitado formado de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, IgG-OVA/SHAr ( $60 \mu g/ml$ ) medindo-se a QL (15 min,  $37^\circ C$ ) ou estimulados com IC imobilizado formado de IgG-OVA medindo-se a QL (30 min,  $37^\circ C$ ) em luminômetro. **a)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **b)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **c)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHAr; **d)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHAr; **e)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC imobilizado formado de IgG-OVA; **f)** Perfil de QLlum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC imobilizado formado de IgG-OVA. Experimentos em duplicata e comparados com controle saudável, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN. **Abreviaturas:** HBSS: sigla do inglês, Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; QLlum: quimiluminescência dependente de luminol; c.p.m: contagem de fótons por minuto; E: espontâneo; AR: Artrite Reumatoide; IC: Imunocomplexo; IgG-OVA: Imunoglobulina G anti Ovoalbumina; SHN: Soro Humano Normal; SHAr: Soro Humano artrite reumatoide; OVA: Ovoalbumina.



Ver legenda na página seguinte.

**Figura 4.6. Valores de Área Integrada e de Porcentagem de Inibição de Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via FcγR ou FcγR+CR.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 (1 μmol/L), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC precipitado formado de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, IgG-OVA/SHAr (60μg/ml) medindo-se a QL (15 min, 37°C) ou estimulados com IC imobilizado formados de IgG-OVA medindo-se a QL (30 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Área integrada de QLlum de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **b)** Porcentagem de Inibição de QLlum calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente) de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **c)** Área integrada de QLlum de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr; **d)** Porcentagem de Inibição de QLlum calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente) de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr. As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. Resultados expressos como média ± desvio padrão em duplicatas. Dados experimentais para neutrófilos estimulados com IC precipitado foram obtidos a partir de 19 pacientes AR ativa, 17 pacientes AR inativa e 30 controles. Já os dados para neutrófilos estimulados com IC imobilizado foram obtidos a partir de 9 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 10 controles. **Análises estatísticas:** amostras que não compartilham da mesma letra (a, b, c, d) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; QLlum: quimioluminescência dependente de luminol; c.p.m: contagem de fótons por minuto; E: espontâneo; AR: Artrite Reumatoide; IC: Imunocomplexo; IgG-OVA: Imunoglobulina da classe G anti Ovoalbumina; SHN: Soro Humano Normal; SHAr: Soro Humano artrite reumatoide; OVA: Ovoalbumina.

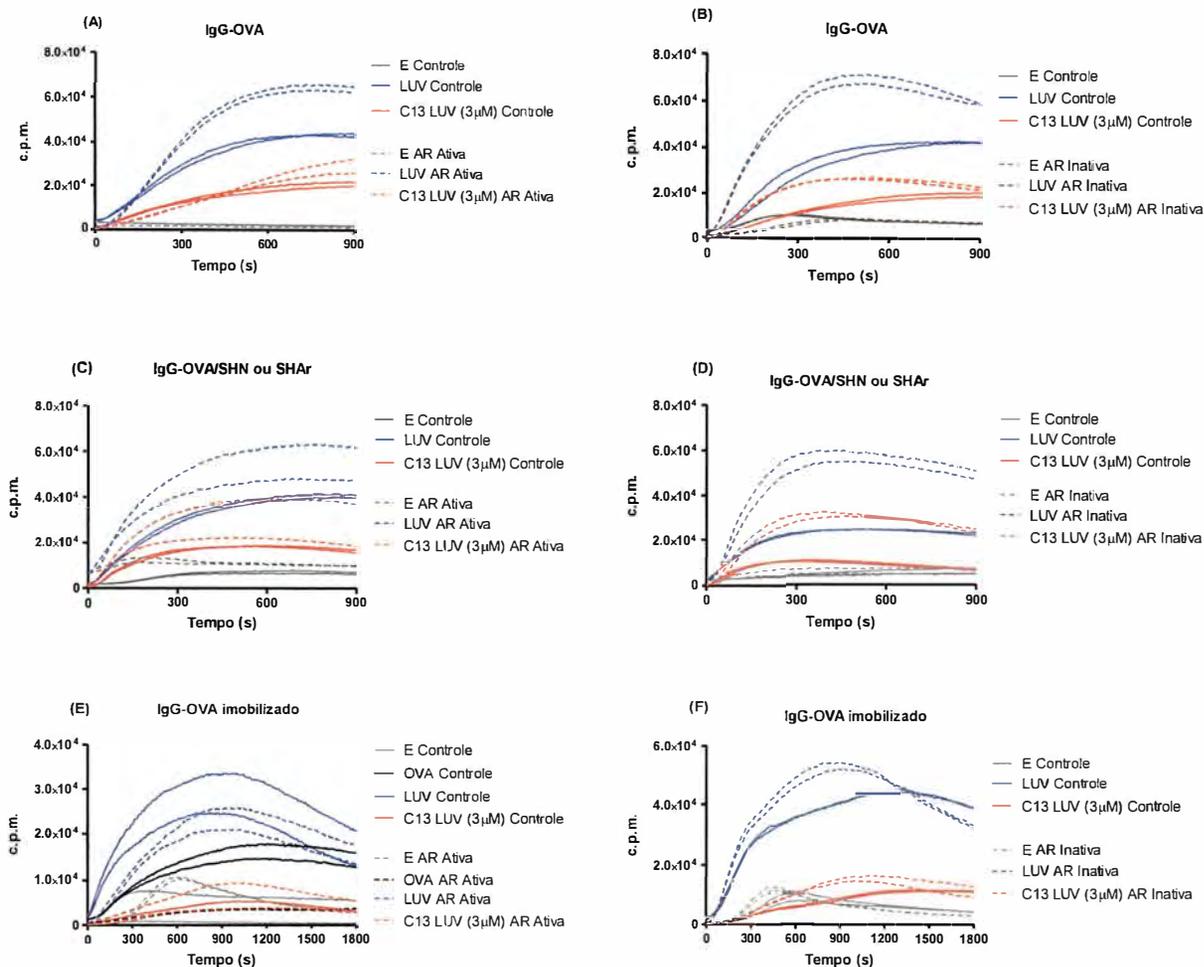
#### **4.3.2. A C13, incorporada em lipossomas, mantêm a capacidade de modular negativamente a produção de ERO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FcγR ou FcγR+CR**

Nos experimentos *in vitro* realizados anteriormente, o derivado 3-fenilcumarínico modulou negativamente o metabolismo de neutrófilos de pacientes com AR, quando os mesmos foram estimulados por diferentes tipos de IC. Esse resultado reforça a ideia do emprego futuro da C13 como uma possível terapia adjuvante de aplicação em pacientes com AR. Sabendo das características bioquímicas da C13, e tendo em vista que ela atua como antioxidante, e que sua atividade pode ser neutralizada facilmente no organismo é necessário proporcionar “proteção” a esta molécula se pensarmos em aplicá-la como terapia *in vivo*.

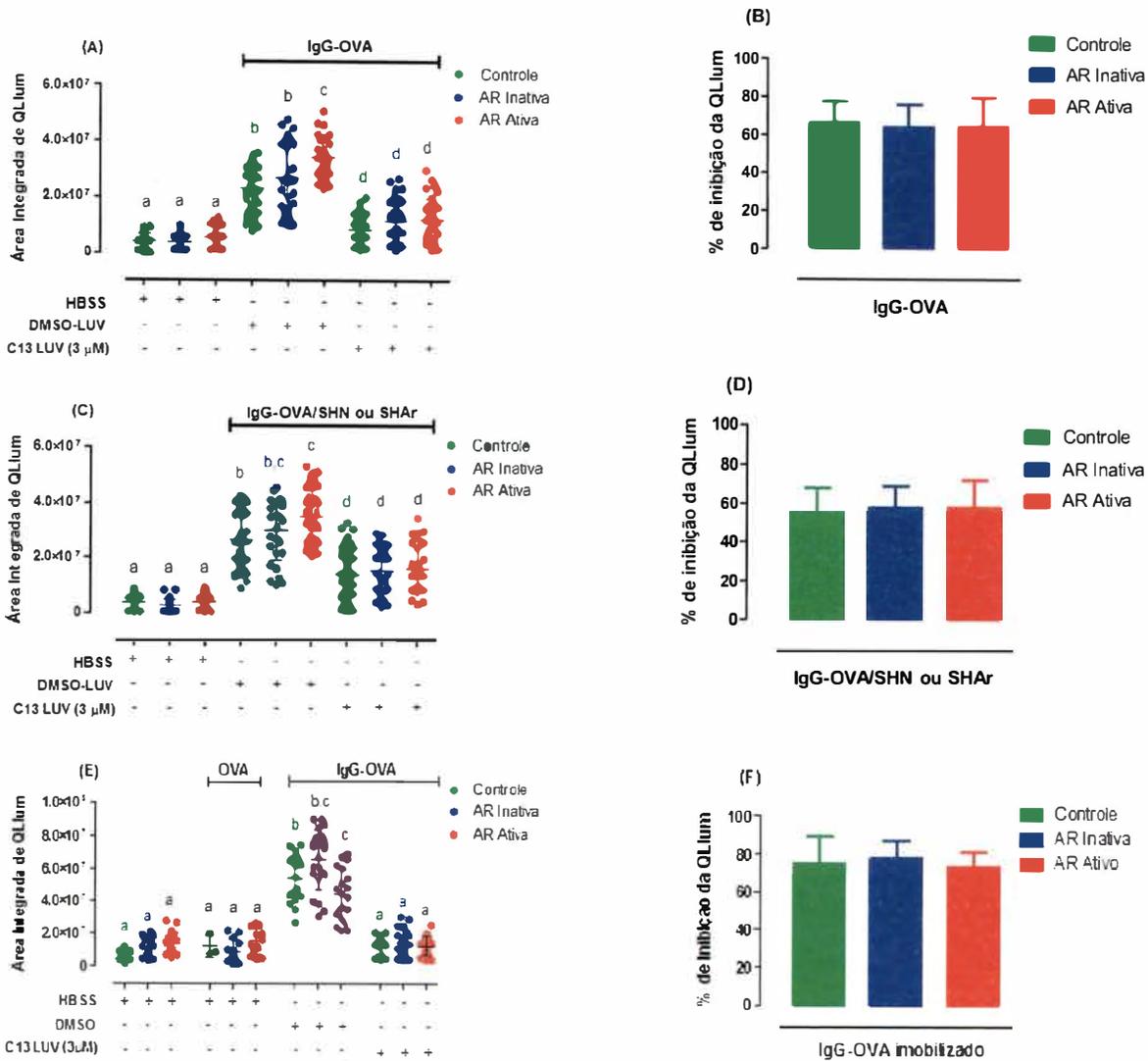
A proposta de “proteção” da atividade antioxidante da C13, foi a incorporação desta molécula em sistemas vesiculares lipídicos, LUV (*Large Unilamellar vesicles*). Visto que esses carreadores ou dispositivos de liberação de drogas, são capazes de entregar mais facilmente a substância no alvo de interesse, e aumentam sua biodisponibilidade, foram realizados experimentos de quimioluminescência para verificar se a atividade inibitória da C13 é mantida

quando incorporada em lipossomas, avançando nas etapas necessárias para que a mesma possa vir a ser utilizada no desenvolvimento de uma terapia adjuvante na fase clínica no futuro.

Podemos observar nas figuras 4.7 e 4.8 que o derivado 3-fenilcumarínico C13 incorporado em lipossomas, no valor de CI50 ( $3\mu\text{M}$ ) previamente estabelecido por Andrade M F, 2016; inibiu aproximadamente 50% da quimioluminescência produzida pelos neutrófilos, quando estimulados pelos mesmos estímulos do experimento anterior. A figura 4.7 mostra perfis representativos de QLlum, referente a um experimento de pacientes com artrite reumatoide ativa e inativa para os diferentes estímulos. Na figura 4.8 estão representados os valores de área integrada referente a QLlum e valores de porcentagem de inibição da C13, incorporada em lipossomas, nos diferentes estímulos utilizados.



**Figura 4.7. Perfis cinéticos representativos de quimiluminescência dependente de luminol (QLum) de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 encapsuladas em lipossomas (C13 LUV) e estimulados via Fcγ ou FcγR+CR.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 incorporada em lipossomas (C13 LUV - 3 µmol/L), LUV DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC precipitado formado de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, IgG-OVA/SHAr (60 µg/ml) medindo-se a QL (15 min, 37°C) ou estimulados com IC immobilizado formado de IgG-OVA medindo-se a QL (30 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **b)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **c)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHAr; **d)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHAr; **e)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR ativa, estimulados por IC immobilizado formado de IgG-OVA; **f)** Perfil de QLum de neutrófilos de AR inativa, estimulados por IC immobilizado formado de IgG-OVA. **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; QLum: quimiluminescência dependente de luminol; c.p.m.: contagem de fótons por minuto; E: espontâneo; AR: Artrite Reumatoide; IC: Imunocomplexo; IgG-OVA: Imunoglobulina da classe G anti Ovoalbumina; SHN: Soro Humano Normal; SHAr: Soro Humano artrite reumatoide; OVA: Ovoalbumina; LUV: Large Unilamellar vesicles.

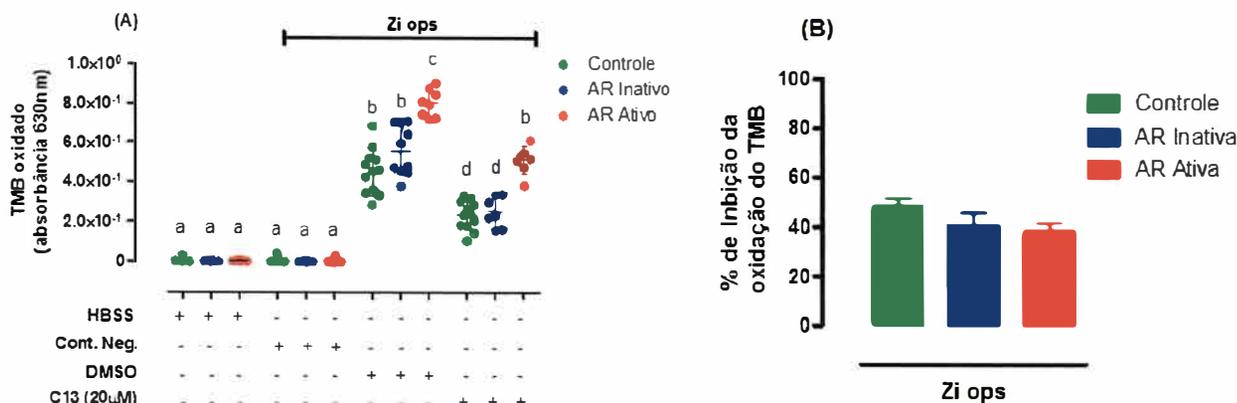


Ver legenda na página seguinte.

**Figura 4.8. Valores de Área Integrada e de Porcentagem de Inibição de Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos periféricos de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 incorporada em lipossomas (C13 LUV) e estimulados via FcγR ou FcγR+CR.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 incorporada em lipossomas (C13 LUV - 3 μmol/L), LUV DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC precipitado formado de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, IgG-OVA/SHAr (60μg/ml) medindo-se a QL (15 min, 37°C) ou estimulados com IC imobilizado formados de IgG-OVA medindo-se a QL (30 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Área integrada de QLlum de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **b)** Porcentagem de Inibição de QLlum calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente) de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA; **c)** Área integrada de QLlum de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr; **d)** Porcentagem de Inibição de QLlum calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente) de neutrófilos estimulados por IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN ou IgG-OVA/SHAr. As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. Resultados expressos como média ± desvio padrão com medidas em duplicatas. Dados para os experimentos de neutrófilos estimulados com IC precipitado foram obtidos a partir de 19 pacientes AR ativa, 17 pacientes AR inativa e 30 controles. Já os dados experimentais de neutrófilos estimulados com IC imobilizado foram obtidos a partir de 9 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 10 controles. Análises estatísticas: amostras que não compartilham da mesma letra (a, b, c, d) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** **HBSS:** Solução Salina balanceada de Hanks; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **c.p.m:** contagem de fótons por minuto; **E:** espontâneo; **AR:** Artrite Reumatoide; **IC:** Imunocomplexo; **IgG-OVA:** Imunoglobulina da classe G anti Ovoalbumina; **SHN:** Soro Humano Normal; **SHAr:** Soro Humano artrite reumatoide; **OVA:** Ovoalbumina; **LUV:** sigla do inglês, Large Unilamellar vesicles.

#### **4.3.3. A C13, na forma livre, modula negativamente a atividade da enzima mieloperoxidase de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via CR**

Na realização deste ensaio, podemos observar que os neutrófilos de pacientes com AR em atividade, produzem mais HOCl do que neutrófilos de paciente com AR inativa e células de indivíduos saudáveis. Quando essas células são tratadas com C13 na concentração de 1μM, não ocorre a inibição da produção de HOCl (dados não mostrado)., No entanto, na concentração de 20 μM, ocorreu inibição de aproximadamente 50% da produção de HOCl (figura 4.9) indicando que a C13 pode estar interferindo na MPO.



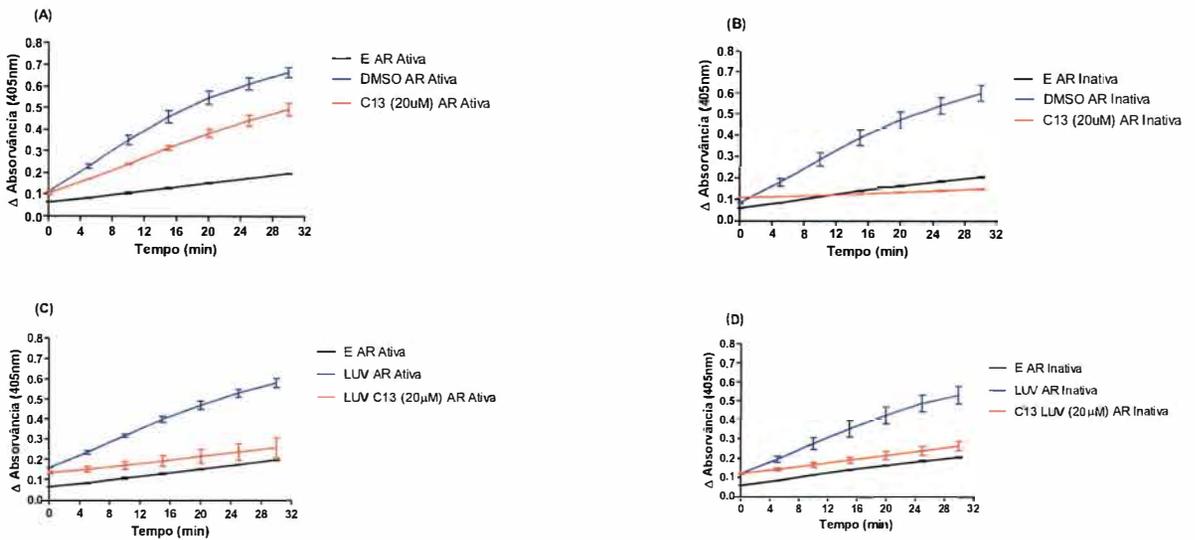
**Figura 4.9. Valores da Oxidação do TMB e da Porcentagem de TMB oxidado pela Taurina-cloramina proveniente da produção de HOCl pela MPO de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, incubados com C13 na forma livre e estimulados via CR com zimosan opsonizado.** Neutrófilos ( $4 \times 10^6$  ml) foram tratados com taurina (5mM) e incubados DMSO (controle positivo - 0,1%); ou HBSS (controle negativo - com adição de catalase no início da reação); ou C13 (20  $\mu$ mol/L). As células foram estimuladas com zimosan opsonizado opsonizado com soro humano normal (3mg/mL) de indivíduos saudáveis, medindo-se a absorbância da reação em espectrofotômetro (630 nm). **a)** valores de absorbância referente à oxidação do TMB; **b)** Porcentagem de Inibição da oxidação do TMB calculada em relação ao (DMSO 0,1% - controle positivo (100% de oxidação do TMB)). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados com 8 pacientes AR ativa, 8 pacientes AR inativa e 8 controles, com medidas em duplicatas. **Análises estatísticas:** amostras que não compartilham da mesma letra (a, b, c, d) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; AR: Artrite Reumatoide; HOCl: ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; Ziops: zimosan opsonizado; TMB: tetrametilbenzidina.

#### 4.3.4. A C13, livre e incorporada em lipossomas, modula negativamente a desgranulação de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via $Fc\gamma R$

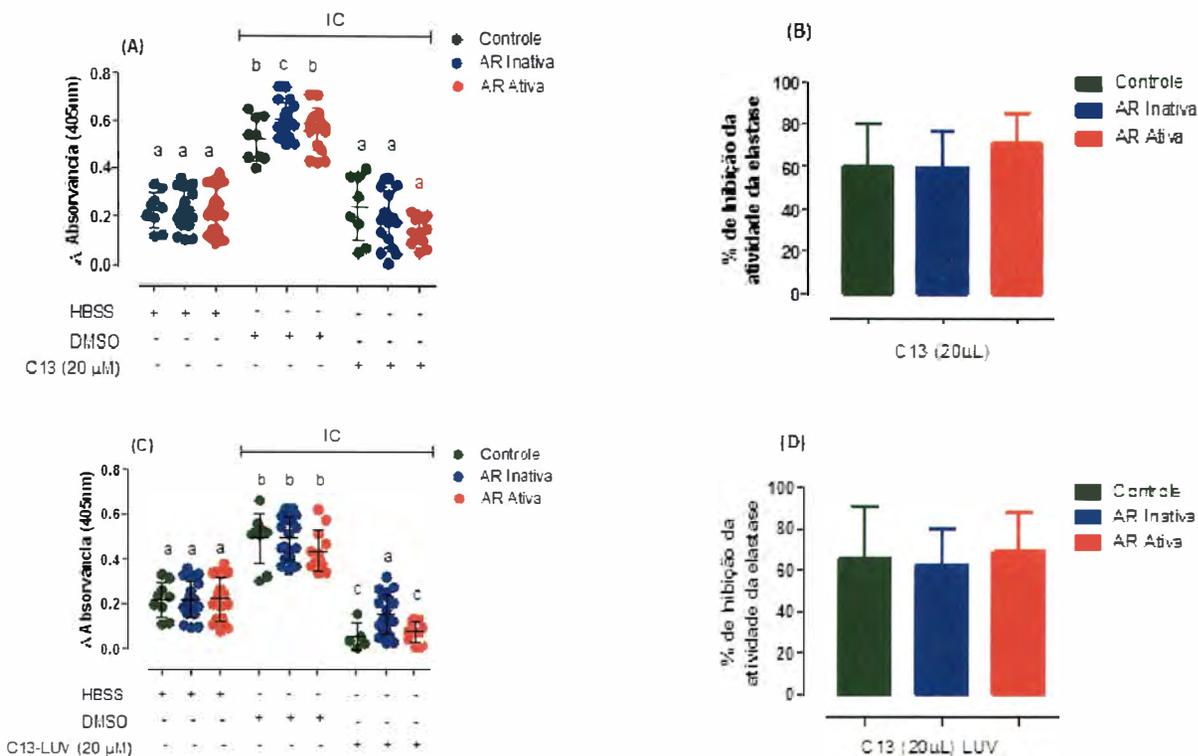
Uma das manifestações clínicas da AR é a injúria nas articulações. Nesses locais, há acúmulo de imunocomplexos, que por sua vez promove o recrutamento, a ativação e a desgranulação de neutrófilos. E para que a liberação de grânulos ocorra, é presumivelmente necessário a participação e mobilização de espécies reativas de oxigênio. Visto que a C13 modula a produção de ERO, foi avaliado o efeito desta molécula sobre a atividade de um dos grânulos liberados no processo de desgranulação, a enzima elastase.

A atividade da enzima elastase foi avaliada através da degradação do substrato SAAVNA. A C13 inibiu cerca de 60% da capacidade do neutrófilo de liberar a enzima elastase, tanto na forma livre como também quando a mesma foi incorporada em lipossomas. A Figura

4.11. representa a cinética da atividade da elastase, liberada de neutrófilos previamente incubados com a C13. Na figura 4.11 os valores de absorvância para o tempo de 30 minutos e a porcentagem de inibição da atividade da elastase pela C13, calculada em relação ao tratamento com DMSO (0,1%) estão representados, respectivamente.



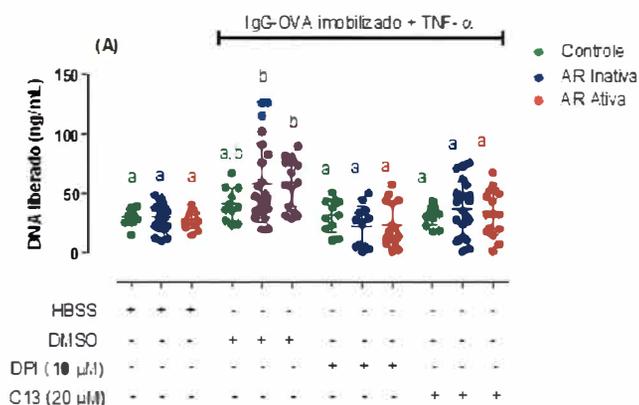
**Figura 4.10. Perfil cinético representativo da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos, de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados previamente com C13 livre ou incorporada em lipossomas e estimulados via FcγR.** Neutrófilos ( $4 \times 10^6$  ml) foram tratados (30 min, 37°C, 50 rpm) com C13 livre ou incorporada em lipossomas (20  $\mu\text{mol/L}$ ), DMSO (0,1% - controle negativo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, e em seguida estimulados, com Imunocomplexos imobilizado (iIC) formados de IgG-OVA, por 1 hora (37°C, 50 rpm). **a)** Perfil cinético representativo da atividade da elastase de neutrófilo de AR ativa tratados com C13 livre; **b)** Perfil cinético representativo da atividade da elastase de neutrófilo de AR inativa tratados com C13 livre; **c)** Perfil cinético representativo da atividade da elastase de neutrófilo de AR ativa tratados com C13 incorporada em lipossomas; **d)** Perfil cinético representativo da atividade da elastase de neutrófilo de AR inativa tratados com C13 incorporada em lipossomas. Resultados representativos de um experimento expressos como média  $\pm$  desvio padrão, com medidas em duplicatas. **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; AR: Artrite Reumatoide; SAAVNA: N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.



**Figura 4.11. Valores de absorbância e de Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados previamente com C13, livre ou incorporada em lipossomas, e estimulados via FcγR.** Neutrófilos ( $4 \times 10^6$  ml) foram tratados (30 min,  $37^\circ\text{C}$ , 50 rpm) com C13 livre ou incorporada em lipossomas (20 μmol/L), DMSO (0,1% - controle negativo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, e em seguida estimulados com Imunocomplexos imobilizados (iIC) formados de IgG-OVA por 1 hora ( $37^\circ\text{C}$ , 50 rpm). **a)** Valores de absorbância após 30 minutos de incubação da enzima elastase, proveniente de neutrófilos incubados com C13 livre na forma livre; **b)** Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase calculada em relação ao DMSO (0,1% - controle solvente), de neutrófilos tratados com C13 livre. **c)** Valores de absorbância após 30 minutos de incubação da enzima elastase, proveniente de neutrófilos incubados com C13 incorporada em lipossomas; **d)** Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase calculada em relação ao DMSO (0,1% - controle solvente), de neutrófilos tratados com C13 incorporada em lipossomas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados com 09 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 5 controles, com medidas em duplicatas. **Análises estatísticas:** amostras que não compartilham da mesma letra (a, b, c) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** **HBSS:** Solução Salina balanceada de Hanks; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **AR:** Artrite Reumatoide; **SAAVNA:** Nsuccinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

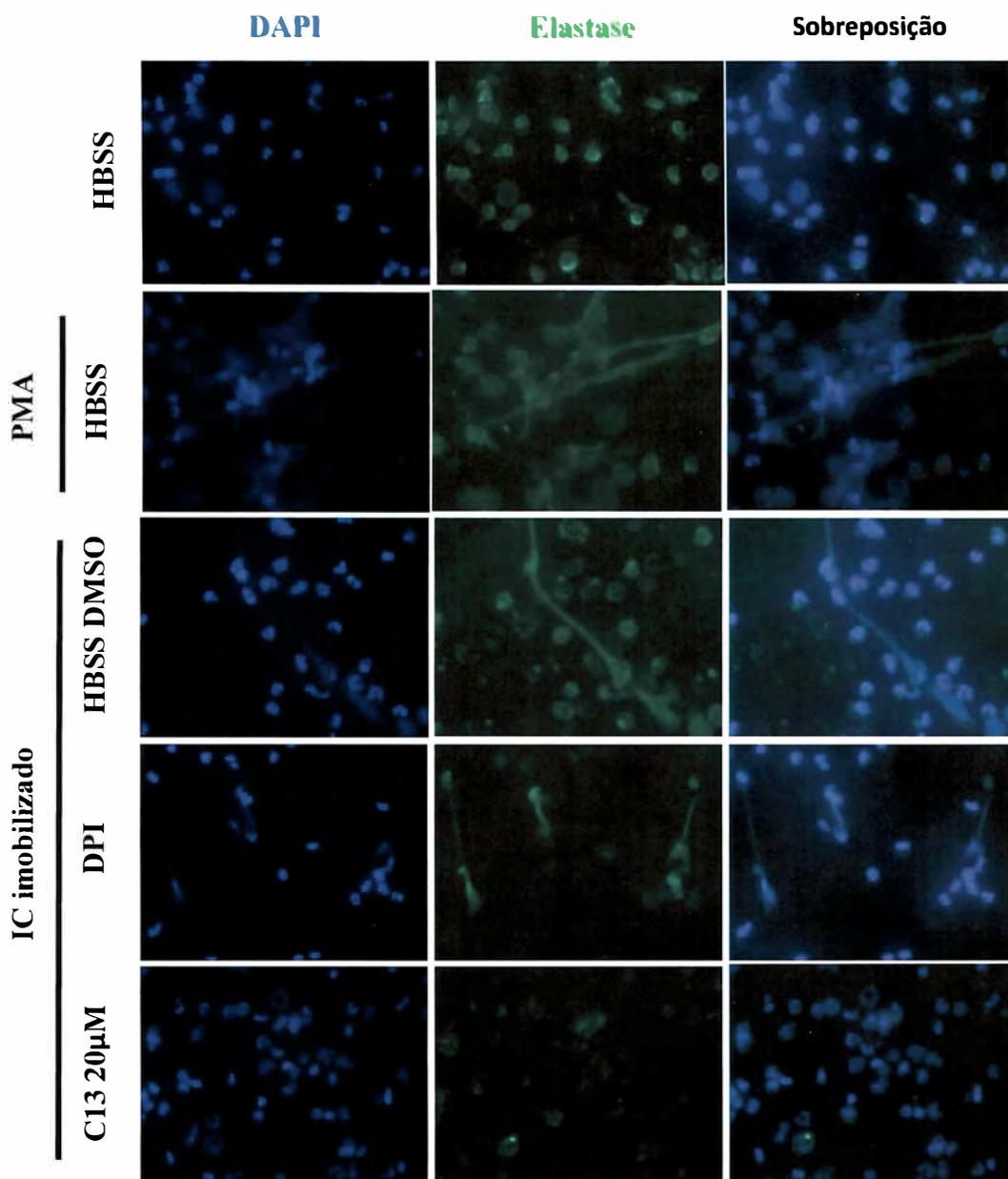
#### 4.3.5. A C13, na forma livre, modula negativamente a formação e liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados via FcγR

A formação das NETs, dependendo do estímulo que as produzem, é um evento que está diretamente relacionado com as ERO. Dessa forma, como o derivado 3-fenilcumarínico apresenta forte atividade antioxidante, foram realizados experimentos para verificar se o mesmo seria um potencial modulador da formação e liberação das NETs. Pela análise do Kit Picogreen, os dados representados na figura 4.10 demonstram um significativo aumento na liberação do DNA nuclear de neutrófilos de pacientes com artrite inativo (primados com TNF- $\alpha$ ) e estimulados por Imunocomplexos Imobilizados (iIC), em relação aos neutrófilos dos indivíduos saudáveis. Quando tratados com a C13, o processo de formação e liberação de NETs foi inibido tanto nos pacientes ativo e inativo, como também nos indivíduos saudáveis. Foi possível observar ainda, que o tratamento com o DPI (controle positivo) reduziu drasticamente a formação e liberação dessas redes de material genético.



**Figura 4.12. Quantificação da liberação de DNA de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados com C13, na forma livre, e estimulados via Fc $\gamma$ R.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (15 min, 37°C, 50 rpm) com C13 (20  $\mu$ mol/L), DPI (1  $\mu$ mol/L), DMSO (0,1% - controle negativo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, primados com TNF- $\alpha$  humano (15 min, 37°C, 50 rpm) e em seguida estimulados com Imunocomplexos imobilizado (iIC) formados de IgG-OVA por 6 horas (37°C, 50 rpm). A quantificação do DNA liberado foi realizada por meio do Kit Picogreen - Invitrogen. As células tratadas com HBSS não foram estimuladas. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados com 10 pacientes AR ativa, 12 pacientes AR inativa e 7 controles, com medidas em duplicatas. **Análises estatísticas:** amostras que não compartilham da mesma letra (a, b) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; DPI: difenileno-iodônio; AR: Artrite Reumatoide; IC: Imunocomplexo; TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa.

Para confirmar que a C13 seria um potencial modulador da formação e liberação das NETs, foram realizados experimentos com células de pacientes com AR ativa, onde as NETs foram visualizadas por meio de Microscopia de Fluorescência. As imagens da figura **4.11**, mostram que o iC foi capaz de estimular a formação e liberação das NETs. Pode-se observar ainda que as células tratadas com DMSO 0,1%, apresentaram uma rede de material genético extracelular, marcadas em azul pelo DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol), e associadas a essa rede está, com marcação em verde, a enzima elastase, demonstrando que de fato essa rede extracelular são as NETs. Foi possível observar ainda, que o tratamento com o DPI reduziu drasticamente a formação e liberação dessas redes de material genético. Esses dados revelam que as condições experimentais para a avaliação da formação e liberação das NETs foram bem estabelecidas. Quando as células foram incubadas com a C13 (20  $\mu\text{mol/L}$ ), a formação e liberação das NETs foi modulada negativamente, confirmando os dados obtidos anteriormente.



**Figura 4.13. Visualização da formação e liberação de Redes Extracelulares de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide incubados com C13, na forma livre, e estimulados via FcγR.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  ml) foram tratados (15 min, 37°C, 50 rpm) com C13 (20 µmol/L), DPI (1 µmol/L), DMSO (0,1% - controle negativo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, primados com TNF-α humano (15 min, 37°C, 50 rpm) e em seguida estimulados com Imunocomplexos imobilizados (iIC) formados de IgG-OVA ou PMA ( $10^{-7}$  mol/L) por 6 horas (37°C, 50 rpm). A marcação da elastase foi feita com anticorpo primário (IgG anti-elastase de neutrófilos humanos). Anticorpo secundário (anti-IgG) acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 (verde) foi utilizado para a visualização em microscopia de fluorescência invertido (objetiva 40). O núcleo da célula foi marcado com DAPI. As imagens são representativas de dois experimentos. **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; DAPI: 4,6 diamino-2-fenilindol; AR: Artrite Reumatoide; IC: Imunocomplexo; TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa. PMA: acetato de miristoilforbol.

**PARTE III: Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência e morte de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em condições de cultura**

#### **4.4. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos processos de sobrevivência de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mantidos em condições de cultura**

Já era sabido que de 15 a 30 min, período de tempo decorrido nas incubações necessárias à realização dos experimentos anteriores, a máxima concentração de C13 (20  $\mu\text{M}$ ), não apresentava efeito citotóxico para neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (Andrade *et al.*, 2013). No intuito de uma possível aplicação dessa substância como terapia adjuvante ao tratamento de pacientes em fase aguda do desenvolvimento da artrite reumatoide, viu-se a necessidade de aumentar o tempo de incubação dos neutrófilos com a C13, afim de verificar se num período de tempo maior (18 horas), a C13 seria capaz de interferir na viabilidade dessas células.

##### **4.4.1. A C13 não afeta a viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos sob condições de cultura, e avaliados pelo método de exclusão ao corante azul de Tripan**

Para avaliar se o derivados 3-fenilcumarínico, nas concentrações de estudo, 1 e 20  $\mu\text{M}$ ), apresentavam atividade tóxica sobre os neutrófilos sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, foram realizados os ensaios de exclusão ao corante azul de Tripan.

Células tratadas com as duas concentrações de C13 ou solvente (DMSO 0,1%) apresentaram-se viáveis no ensaio de exclusão ao corante azul de Tripan, sendo estes resultados semelhantes ao controle negativo (Hanks) (Tabela 4.2). Dessa forma, nas condições avaliadas, a C13 não apresenta citotoxicidade sobre os neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR mantidos em condições de cultura por 18 horas.

**Tabela 4.2.** Avaliação do efeito citotóxico do derivado 3-fenilcumarínico sobre os neutrófilos de pacientes com AR mantidos em cultura por 18 horas. <sup>(a)</sup>

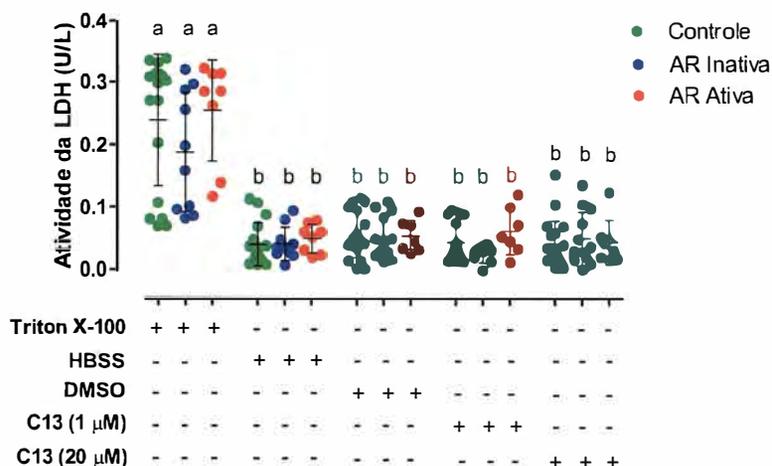
Substância <sup>(b)</sup>	Células Viáveis (%)	
	Controle	Paciente
<b>Triton X-100 (0,2%)</b>	-----	-----
<b>HBSS</b>	92,06 ± 5,97	96,94 ± 1,08
<b>DMSO</b>	92,99 ± 2,35	95,57 ± 2,54
<b>C13 (1 µM)</b>	95,58 ± 2,31	96,30 ± 1,20
<b>C13 (20 µM)</b>	91,35 ± 2,86	91,25 ± 6,83

(a) Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. Dados determinados pelo ensaio de exclusão ao Azul de Tripán, com base na contagem de 200 células.

(b) Triton X-100 0,2% (controle positivo); Hanks suplementado com 0,1% de gelatina (controle negativo); DMSO 0,1% (controle do solvente); derivado 3-fenilcumarínico avaliados em 1 e 20 µM.

#### **4.4.2. A C13 não afeta a viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura, e avaliados pelo método de liberação da enzima LDH**

Neste método, não houve diferença na porcentagem de LDH liberada em relação ao controle (Hanks), para as células tratadas com a C13 ou solvente. Além disso, os valores da atividade da LDH nas amostras e no controle negativo foram muito menores que os obtidos para o controle positivo (0,2% de Triton X-100). Portanto, esse dado corrobora que a C13 não apresenta citotoxicidade sobre os neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR, mantidos em condições de cultura por 18 horas.

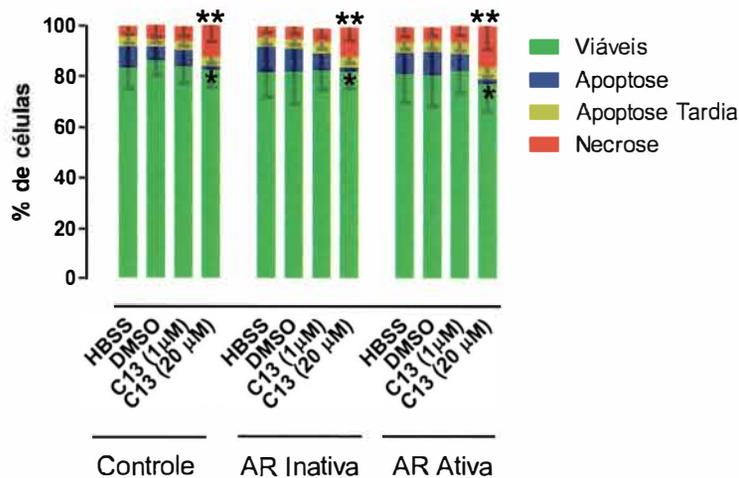


**Figura 4.14. Determinação da Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) do sobrenadante de cultura de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR incubados com a C13 por 18 horas.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) foram incubados com C13 (1 - 10µM), DMSO (0,1%), Hanks (suplementado com 0,1% de gelatina) ou Triton X-100 (0,2%) durante 18 horas sob condições de cultura em câmara de (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C) o sobrenadante da cultura foi utilizado para a determinação da atividade da LDH liberada que foi calculada conforme instruções do fabricante do kit. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados com 04 pacientes AR ativa, 06 pacientes AR inativa e 18 controles, com medidas em duplicatas. **Análises estatísticas:** amostras que não compartilham da mesma letra (a, b) são significativamente diferentes; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; AR: Artrite Reumatoide; LDH: lactato desidrogenase.

#### 4.4.3. A C13 altera o índice de apoptose e necrose de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados utilizando anexina V-APC e iodeto de propídio propídio (PI) em citometria de fluxo

A fim de corroborar com os dados anteriores, foi analisado se a C13 interfere no processo de apoptose ou provoca necrose de neutrófilos de pacientes com AR ativa ou inativa, mantidos em condições de cultura por um período de 18 horas. Esses experimentos foram realizados utilizando-se citometria de Fluxo, por meio do uso de Anexina-V e Iodeto de Propídio de acordo com os resultados apresentados na figura 4.15 a porcentagem de células viáveis, apoptóticas, apoptóticas tardias e necróticas não foram significativamente alteradas, quando comparado HBSS, DMSO e C13 (1µM) entre os neutrófilos provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes com AR ativa ou inativa. No entanto, na concentração de 20µM a C13, de certa forma, modulou os estágios de morte dos neutrófilos, pois esse tratamento mostrou uma diferença significativa em relação os demais tratamentos, reduzindo a porcentagem de células em

apoptose e aumentando o número de células em necrose, mas não alterou a porcentagem de células viáveis.

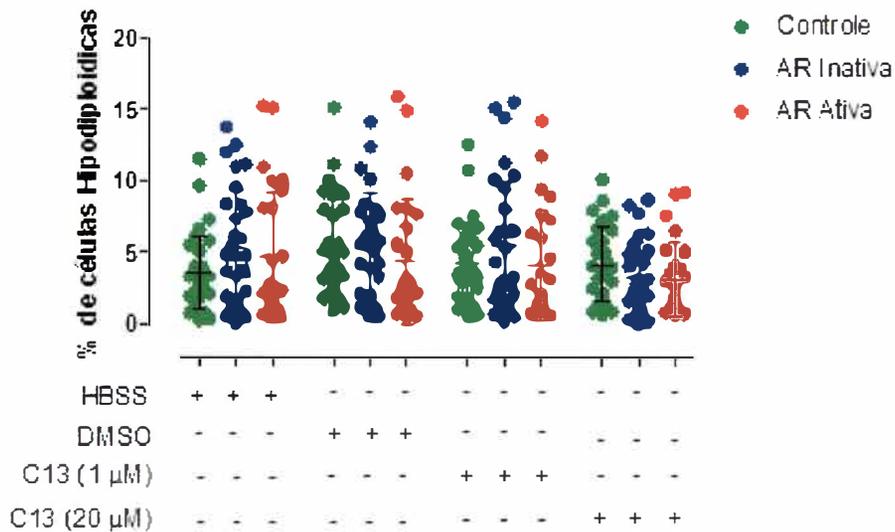


**Figura 4.15. Viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR incubados com C13 em condições de cultura, por 18 horas: análise do índice de apoptose e necrose utilizando citometria de fluxo.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) foram incubados com C13 (1 - 20  $\mu$ M), DMSO (0,1%) ou Hanks suplementado com 0,1% de gelatina e mantidos em condições de cultura (5% de  $\text{CO}_2$  (5%), 37°C) por 18 horas. As células foram analisadas em citômetro de fluxo quanto à porcentagem de células viáveis (Anexina V- e PI-), em apoptose (Anexina V+ e PI-), em apoptose tardia (Anexina V+ e PI+) e em necrose (Anexina V- e PI+). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 50 experimentos diferentes (10 pacientes AR ativa, 20 pacientes AR inativa e 20 controles), com medidas em duplicata. **Análises estatísticas:** amostras que apresentam (\*) diferem na apoptose em relação aos demais tratamentos; amostras que apresentam (\*\*) diferem na necrose em relação aos demais tratamentos; ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** **HBSS:** Solução Salina balanceada de Hanks; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **AR:** Artrite Reumatoide; **PI:** Iodeto de Propídio.

#### 4.4.4. A C13 não altera o conteúdo de DNA de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados por meio de Hipodiploidia

A fim de corroborar com os dados de apoptose e necrose dos neutrófilos mantidos em cultura descritos no item anterior, foi realizada a análise da fragmentação do material genético dessas células incubadas com C13 (1 - 20  $\mu$ M), já que a fragmentação do DNA nuclear é uma das principais características da morte celular programada. Os experimentos foram realizados utilizando-se citometria de Fluxo, por meio do uso de Iodeto de Propídio. Conforme observado na figura 4.16, a porcentagem de células hipodiplóides não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, nem tampouco entre os grupos experimentais (pacientes com AR ativa, AR inativa e indivíduos saudáveis). Contudo na concentração de 20  $\mu$ M, a C13 mostrou uma

tendência em reduzir a porcentagem de Hipodiploidia para os três grupos experimentais estudados, confirmando os dados observados no item anterior quando esse tratamento aumentou a porcentagem de células em necrose e reduziu a porcentagem de células apoptóticas incubadas nas mesmas condições de cultura e tempo deste experimento.



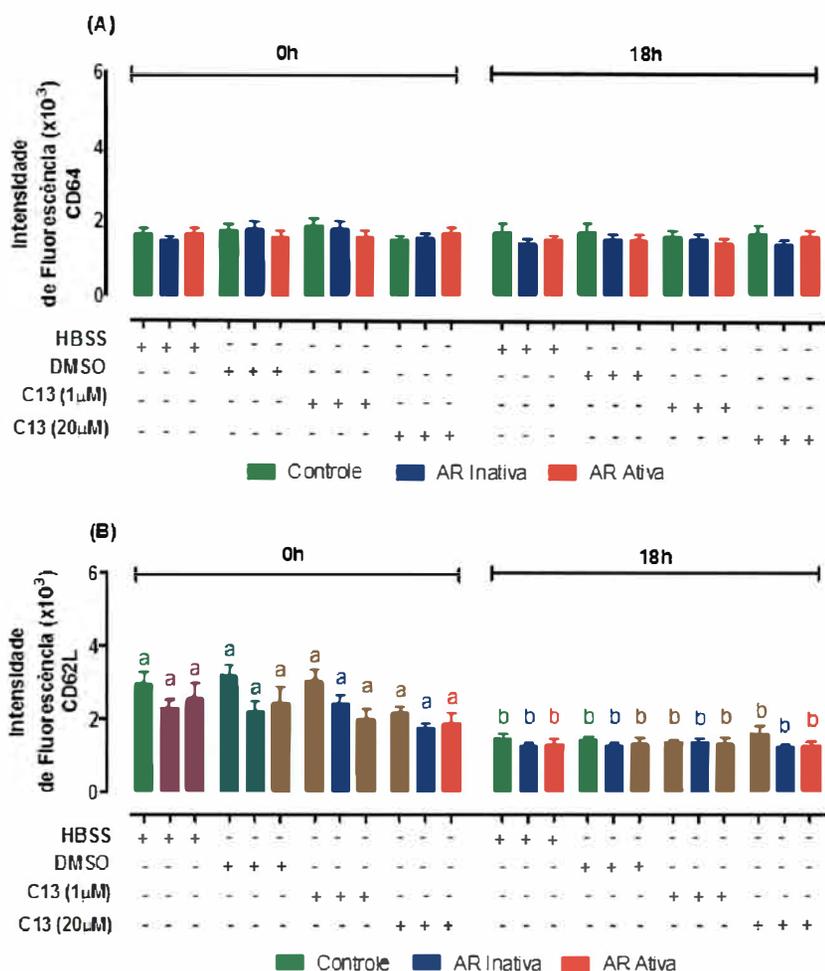
**Figura 4.16. Porcentagem de células hipodiplóides provenientes de sangue periférico de pacientes com AR e incubados com C13 em condições de cultura por 18 horas.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) incubados com C13 (1 - 20µM), DMSO (0,1%) ou Hanks suplementado com 0,1% de gelatina e mantidos em cultura CO<sub>2</sub> (5%), 37°C por 18 horas. As células foram analisadas em citômetro de fluxo quanto à porcentagem de células hipodiploides utilizando Iodeto de Propídio (PI). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 60 experimentos diferentes (20 pacientes AR ativa, 20 pacientes AR inativa e 20 controles), com medidas em duplicata. Análises estatísticas: ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** HBSS: Solução Salina balanceada de Hanks; DMSO: dimetilsulfóxido; AR: Artrite Reumatoide; PI: Iodeto de Propídio.

#### 4.4.5 A C13 não altera a expressão dos receptores de membrana CD64 e CD62L de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, mantidos em condições de cultura e avaliados utilizando citometria de fluxo

O receptor CD64 é expresso na membrana da célula quando a mesma está ativada (Moulding *et al.*, 1999). Por sua vez, a medida que os neutrófilos envelhecem, reduz-se a expressão em sua membrana celular da molécula de adesão CD62L (Boer *et al.*, 2010; Futosi *et al.*, 2013).

Assim, foi analisada a expressão dessas duas moléculas na membrana celular de neutrófilos mantidos em condições de cultura por 0 e 18 horas em citometria de fluxo. De acordo

com os dados apresentados na figura **4.17.a**, a intensidade de fluorescência da expressão de CD64 manteve-se constante durante os dois períodos de tempo analisados (0 e 18 horas), não havendo diferença entre os tempos, nem contudo, entre os tratamentos ou grupos avaliados (AR ativa, AR inativa e indivíduos saudáveis). Já na figura **4.17.b**, a intensidade de fluorescência para o receptor CD62L, indica sutil diferença entre os tempos avaliados, não havendo diferença entre tratamentos e grupos.



**Figura 4. 17. Mediana de Intensidade de Fluorescência relacionada à expressão dos receptores de membrana celular CD64 e CD62L de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR e incubados com C13 em condições de cultura por 0 e 18 horas.** Neutrófilos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) incubados com C13 (1 - 20µM), DMSO (0,1%) ou Hanks suplementado com 0,1% de gelatina e mantidos em cultura (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C por 0 e 18 horas). As células foram analisadas em citômetro de fluxo quanto à intensidade de fluorescência para marcação dos receptores de membrana (a) CD64 e (b) CD62L. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 78 experimentos diferentes (CD64 tempo 0h: 6 pacientes AR ativa, 9 pacientes AR inativa e 6 controles; CD64 18h: 6 pacientes AR ativa, 7 pacientes AR inativa e 5 controles; CD62L 0h: 6 pacientes AR ativa, 6 pacientes AR inativa e 9 controles; CD62L 18h: 6 pacientes AR ativa, 7 pacientes AR inativa e 5 controles), com medidas em duplicata. **Análises estatísticas:** ANOVA two way seguido de Tukey's multiple comparisons test ( $p < 0,05$ ). **Abreviaturas:** **HBSS:** Solução Salina balanceada de Hanks; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **AR:** Artrite Reumatoide

## **V. DISCUSSÃO**

Diversas pesquisas têm procurado entender a importância dos neutrófilos para a resolução do processo inflamatório, como também descobrir novos alvos e estratégias terapêuticas capazes de minimizar os efeitos indesejáveis do recrutamento excessivo dessas células para o foco da inflamação (Poon *et al.*, 2014). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos de Derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com imunocomplexos, como também vem analisando as alterações bioquímicas e funcionais de neutrófilos de pacientes com doenças autoimunes, principalmente a artrite reumatoide, visando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas funções destas células e a seleção de novos alvos terapêuticos para um tratamento mais adequado dessas patologias.

Kabeya e colaboradores avaliaram o efeito de um grupo de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados via Fc $\gamma$ R, onde algumas dessas substâncias inibiram de modo seletivo, diferentes etapas do processo em questão. A partir dos resultados obtidos, foram realizadas análises de relação quantitativa estrutura-atividade bidimensional e tridimensional (QSAR-2D e QSAR-3D, respectivamente), que direcionaram a seleção de algumas moléculas, consideradas promissoras como moduladoras do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Em trabalho mais recente, foi observado efeito semelhante dos derivados 3-fenilcumarínicos selecionados, em neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis estimulados via Fc $\gamma$ R. Uma dessas fenilcumarinas, a 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13), possui atividade moduladora sobre a enzima mieloperoxidase, como também exerce importante atividade “*scavenger*” de intermediários de oxigênio (Andrade *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi observado que essa mesma substância é capaz de modular negativamente a desgranulação e o processo de formação e liberação de NETs de neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (Andrade M.F., 2016).

Tendo em vista que os neutrófilos participam ativamente dos estágios iniciais do desenvolvimento da artrite reumatoide e que o acúmulo de complexos imunes, na sinóvia inflamada desses pacientes, é um fator importante para o estabelecimento da doença, por favorecer o recrutamento e a ativação exacerbada dessas células para o local da inflamação, o estudo de possíveis moléculas capazes de modular as funções efetoras dessas células é essencial e importante. Dessa forma, nesse trabalho avaliou-se o efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, livre e/ou encapsulado em lipossomas (LUV), no metabolismo oxidativo de neutrófilos de

sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide desencadeado pela ativação dos receptores Fc $\gamma$ , como também receptores CR, e a cooperação entre ambos. As demais funções dos neutrófilos, como desgranulação e formação e liberação das redes de DNA (NETs) também foram avaliadas.

Os resultados mostraram que neutrófilos de pacientes com AR ativa, estimulados com imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA e IgG-OVA/SHAr, produzem mais quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) do que células de pacientes com AR inativa, como também de neutrófilos de indivíduos saudáveis (ver figuras **4.5a**, **4.5b**, **4.5c**, **4.5d** e **4.5f**). Paoliello-Paschoalato e colaboradores (2011), já haviam mostrado esse fenômeno. Quando o estímulo não é fagocitável, como é o caso dos Imunocomplexos Imobilizados (iIC), esse padrão de resposta não foi observado, pois as células dos pacientes com AR ativa apresentaram uma área de QLlum reduzida em relação aos neutrófilos de indivíduos com AR inativa e também em relação aos neutrófilos de indivíduos saudáveis (ver figura **4.5e**). Esse resultado concorda com as observações de (Fairhurst *et al.*, 2007), onde neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR em atividade e que possuem status de células “*primadas*”, ou seja, pré-ativadas, quando colocadas frente a um estímulo não fagocitável, apresentam resposta menor em comparação a estímulos fagocitáveis. As células de pacientes com AR ativa, utilizadas nesse estudo, também possuem status de células “*primadas*”, conforme avaliado em Paoliello-paschoalato (2011).

Existem diversos veículos carreadores de fármacos que, além de outros benefícios, atuam principalmente no aumento da eficiência da ação imunomoduladora de compostos fenólicos e ao mesmo tempo na redução dos efeitos colaterais indesejáveis dos mesmos (Torchilin, 2005; Karn *et al.*, 2013). Um dos carreadores bastante utilizados na incorporação de compostos fenólicos, são os lipossomas, que aumenta a biodisponibilidade e a estabilidade destas substâncias (Huong *et al.*, 2001; Kapoor *et al.*, 2014). Neste trabalho, lipossomas formados de fosfatidilcolina e colesterol foram utilizados para encapsular a C13, uma vez que essas vesículas já foram utilizadas em pesquisas anteriores do grupo (Landi-Librandi *et al.*, 2011; Landi-Librandi *et al.*, 2012; Santos, E. O. L., 2014; Figueiredo-Rinhel, A. G., 2015; Andrade, M. F., 2016). A caracterização físico-química do sistema vesicular lipídico, empregado nos experimentos desse estudo, apresentou um baixo diâmetro (< 800 nm), uma distribuição de tamanho homogênea (caracterizada pelo baixo índice de polidispersão) e uma

carga superficial próxima da neutra (caracterizada pelo baixo valor do potencial zeta) (tabela 4.1.). Tais parâmetros são adequados para o não reconhecimento dos lipossomas pelos mecanismos efetores da imunidade inata, evitando a fácil depuração dos mesmos (Landi-Librandi *et al.*, 2012).

Neste estudo, para avaliar o efeito da C13 no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de pacientes com AR, tanto ativa quanto inativa, as células foram incubadas com a C13, nas formas livre e/ou incorporada em lipossomas (LUV), nas concentrações de  $CI_{50}$  (1  $\mu$ M - livre, 3  $\mu$ M - LUV) isto é, as concentrações necessárias para inibir 50% da QLum de neutrófilos estimulados com IC, previamente estabelecidas (Andrade, M. F., 2016). A C13, tanto na forma livre como no LUV, foi capaz de manter sua capacidade antioxidante, reduzindo 50% da QLum de neutrófilos de pacientes com AR tanto ativa como inativa, estimulados com IC precipitados e também Imunocomplexos Imobilizados (iIC) (ver figuras 4.6. e 4.8.). Como mencionado anteriormente, neutrófilos de pacientes com AR ativa, apresentam metabolismo oxidativo exacerbado, quando comparados com neutrófilos de pacientes com AR inativa, como também neutrófilos de indivíduos saudáveis (Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2011). Isso também pode ser confirmado pelos dados obtidos na figura 4.9, onde neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa produziram mais ácido hipocloroso (HOCl) do que neutrófilos de pacientes com AR inativa e de neutrófilos de indivíduos saudáveis, tendo em vista que a mensuração da oxidação do TMB, pela taurina-cloramina produzida pelas primeiras, foi maior do que a produção das últimas. Portanto, a C13, mesmo em células com maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mesmo quando incorporada em LUV, manteve sua atividade antioxidante, inibindo 50% das ERO produzidas, nas condições analisadas.

Quando complexos imunes se ligam aos receptores  $Fc\gamma R$  e/ou CR presentes na membrana citoplasmática dos neutrófilos, ocorre a ativação dessas células, evento relacionado com a produção das ERO; a fagocitose dos complexos imunes e a formação do fagossoma; o recrutamento dos grânulos citoplasmáticos para o fagossoma e o amadurecimento do mesmo, originando o fagolisossoma, estrutura onde ocorrerá a eliminação do antígeno (Nauseef, 2007; Cassatella *et al.*, 2009; Strydom e Rankin, 2013; Kruger *et al.*, 2015; Lelifeld *et al.*, 2016). Para serem executadas, as funções que o neutrófilo utiliza na eliminação dos agentes infecciosos, dependem direta ou indiretamente do *status redox* da célula (Sakai *et al.*, 2012). Portanto a utilização de substâncias antioxidantes que modulem negativamente o metabolismo oxidativo,

podem interferir nas demais funções celulares (Hattori *et al.*, 2010). Nesse contexto, Andrade, M.F., (2016), observou que o Derivado 3-fenilcumarínico (C13) inibe a desgranulação e a formação e liberação de NETs de neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, quando estimulados. Dessa forma, avaliou-se nesse trabalho se essa substância seria capaz de modular essas mesmas funções em neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR.

Os resultados mostraram que a C13 na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , livre ou lipossomal, inibiu cerca de 80% da desgranulação da enzima elastase de neutrófilos periféricos de pacientes com AR, como também, na forma livre, reduziu pela metade a capacidade dessa célula de formar e liberar as NETs (ver figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13). O fato dessa substância modular negativamente essas duas funções efetoras dos neutrófilos, mostra que ela apresenta também uma atividade anti-inflamatória. Esses dois processos estão intimamente conectados, pois a elastase, quando recrutada para o núcleo da célula, facilita a degradação de histonas, possibilitando a liberação do DNA (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Por sua vez, a liberação da enzima elastase é completamente dependente do *status redox* da célula, já que ela está associada fortemente a matriz de proteoglicana, presente nos grânulos azurófilos, de forma que sua liberação e subsequente ativação é dependente do influxo de íons e da variação do pH fagolisossomal, eventos que estão associados à produção do ânion superóxido pelo complexo enzimático da NADPH oxidase (Reeves *et al.*, 2002). O Derivado 3-fenilcumarínico (C13) desempenha forte atividade “*scavenger*” de radicais livres e modula negativamente a atividade da enzima MPO, alterando o status redox da célula (Kabeya *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2013; Andrade, M. F., 2016). Este efeito inibitório de compostos fenólicos como a C13, está relacionado com a presença do grupo catecol em sua estrutura o que promove alteração no processo de desgranulação da elastase (Blackburn *et al.*, 1987; Kanashiro *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013).

Além disso, as ERO também são importantes na formação das NETs por facilitar a citrulinização de histonas e favorecer a descondensação do material genético (Kawakami *et al.*, 2015). Substâncias antioxidantes que atuam como “*scavenger*” de radicais livres ou interferem no funcionamento das enzimas NADPH oxidase e MPO, dificultam a formação das NETs (Kirchner *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Vorobjeva e Pinegin, 2016). É sabido que as NETs tem, dentre outros efeitos benéficos, o papel de impedir a disseminação de agentes infecciosos através da corrente sanguínea e limitar a inflamação (Fuchs *et al.*, 2012; Schauer *et*

*al.*, 2014). Contudo elas reforçam a patologia de inúmeras doenças, onde aumentam a possibilidade do surgimento de autoantígenos, dentre outros eventos, acentuando e tornando crônico o processo inflamatório (Sangaletti *et al.*, 2012; Khandpur *et al.*, 2013). Drogas capazes de impedir a formação das NETs são importantes principalmente para o tratamento de doenças autoimunes, onde as mesmas são formadas de forma expressiva.

Duas características interessantes na estrutura molecular da C13 estão relacionadas com as atividades antioxidante e anti-inflamatória por ela apresentada, nos dados experimentais apresentados: a presença do grupo substituinte orto-diidroxí nas posições C6 e C7 do esqueleto cumarínico e uma metilenodioxila ligada ao anel fenílico. Como mencionado anteriormente, a primeira característica estrutural estaria relacionada com a atividade “*scavenger*” de radicais de oxigênio e com a atividade moduladora da MPO (Andrade, M. F., 2016), e a segunda estrutura, aumentaria a capacidade dessa substância de interagir com membranas biológicas, servindo como um carreador da mesma para o espaço intracelular e sugerindo que ela possua alvos intracelulares de atuação (Van Acker *et al.*, 1998; Vuotto *et al.*, 2003).

De maneira geral, o derivado 3-fenilcumarínico se mostrou um excelente modulador das funções efetoras de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR *in vitro*. Esses resultados possibilitam que essa substância possa servir de protótipo para o desenvolvimento de fármacos com emprego em processos inflamatórios, onde ocorre o recrutamento em massa de neutrófilos. Dessa forma, pensando-se na aplicação terapêutica dessa substância, foram realizados experimentos visando analisar se a C13 interfere na viabilidade celular de neutrófilos, mantidos em condições de cultura. Tendo em vista que para avaliar a apoptose dessas células faz-se necessário mantê-las em condições de cultura (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C) por um período mínimo de seis horas, a viabilidade das mesmas foi verificada quando elas foram mantidas em cultura por até 18 horas.

De acordo com os dados experimentais, o Derivado 3-fenilcumarínico não apresentou efeito citotóxico, nem quando analisada a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante da cultura celular (ver figura 4.14), nem quando foi realizada a análise de exclusão ao corante azul de Tripán (ver tabela 4.2). A substância também não alterou a viabilidade celular, quando foi realizado o experimento utilizando Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI), já que ambas as concentrações (1 e 20 µM), não mostraram diferença na porcentagem de células viáveis (80%), quando comparadas ao controle (DMSO 0,1%).

Apesar da C13 não interferir na viabilidade celular, as porcentagens de células positivas para Anexina-V (apoptose) ou Iodeto de Propídio (necrose) foram diferentes para células tratadas na concentração de 20  $\mu$ M, aumentando a porcentagem de células em necrose e reduzindo a porcentagem de células em apoptose, quando comparado ao controle (DMSO 0,1%) (ver figura 4.15). Dessa forma, a C13 interferiu nos estágios de morte dos neutrófilos mantidos em condições de cultura por até 18 horas, nas condições analisadas. Esse fato se deve, provavelmente em decorrência da concentração utilizada da C13 (20  $\mu$ M), uma vez que é capaz de inibir praticamente 100% da produção de Qlum. Assim a ausência total de ERO, provocada pelo excesso de antioxidante no meio de cultura, poderia estar favorecendo uma modulação no estágio de morte celular, alterando de uma condição que promove a apoptose espontânea para a uma condição que favorece a necrose. Essa ideia é confirmada por estudos que mostram que em neutrófilos senis, há um aumento na produção de ERO, de forma constitutiva, que induz a liberação de catepsina D dos grânulos azurófilos, ativando a caspase-8, ou à diminuição da produção de glutathione, que atua como inibidor de caspase-8 e caspase-3, resultando no aumento da atividade da caspase e ativação da apoptose espontânea (Geering e Simon, 2011).

Dentre as alterações morfológicas sofridas por neutrófilos em apoptose ocorre a clivagem do material genético, tornando esse material hipodiplóide (Riccardi e Nicoletti, 2006). Apesar de não ser uma redução significativa em relação ao controle (DMSO 0,1%), a permanência das células por 18 horas incubadas com a C13 na concentração de 20  $\mu$ M, reduziu a porcentagem de células hipodiplóides, confirmando os dados obtidos no experimento anterior (ver figura 4.16).

Desde o momento que os neutrófilos deixam a medula óssea até a sua retirada da circulação, essas células apresentam uma variação no nível de expressão de alguns receptores de membrana. Muitas vezes, os níveis de expressão desses receptores reflete o estágio de envelhecimento ou o nível de ativação da célula. O receptor CD62L, por exemplo, tem a sua expressão reduzida à medida que a célula fica madura ou quando as mesmas são ativadas. Por sua vez, a expressão do receptor para a porção cristalizável das imunoglobulinas G, Fc $\gamma$ RI (CD64), é induzida e aumentada à medida que as células são ativadas (Zhang *et al.*, 2015).

De acordo com os dados experimentais, não houve diferença na expressão do receptor CD64, na membrana de neutrófilos de sangue periféricos de pacientes com AR mantidos em cultura, mostrando que as condições de cultivo celular estavam adequadas e que as células não

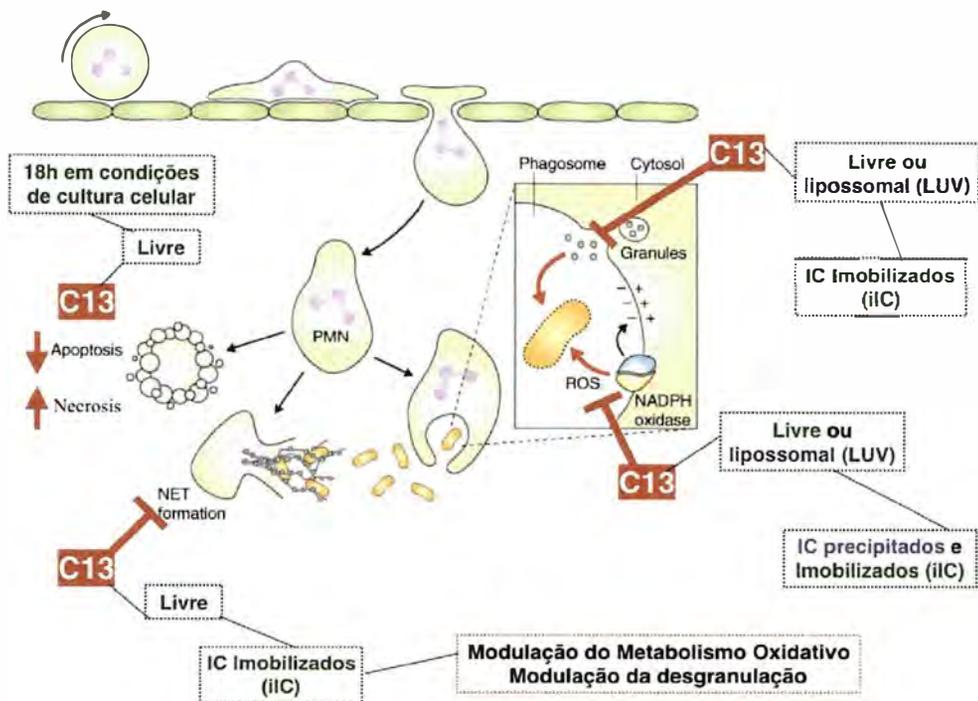
sofreram ativação durante o período de incubação (ver figura **4.17a**). Com relação à expressão do CD62L, houve uma redução na sua expressão para o tempo de 18 horas em relação ao tempo de 0 horas para todos os tratamentos. Portanto, a C13 não alterou o padrão de expressão nem do CD64 nem do CD62L, se comparado com o controle (DMSO 0,1%) de cada tempo (ver figura **4.17b**).

O Derivado 3-fenilcumarínico C13 modula negativamente o metabolismo oxidativo de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide estimulados com diferentes tipos de Imunocomplexos. Na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , a C13 modulou a desgranulação da enzima elastase, como também diminuiu a formação e liberação das NETs pelos neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR estimulados com Imunocomplexos Imobilizados (iIC), sem interferir na viabilidade celular. Assim sendo, esta substância pode servir de protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que poderão ser empregados no tratamento de doenças, onde há intensa participação de neutrófilos como na artrite reumatoide.

## **VI. CONCLUSÃO**

Os resultados desse trabalho mostraram que o Derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13), uma substância sintetizada com base em produtos de origem vegetal, nas concentrações de  $CI_{50}$ -QLlum - estabelecida em experimentos realizados com neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis - , na forma livre ou incorporada em lipossomas (LUV), também foi capaz de inibir cerca de 50% da QLlum de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR ativa ou inativa. Além disso, nessas mesmas condições, não interferiu nas demais funções efetoras dos neutrófilos avaliadas. Contudo, na máxima concentração avaliada (20  $\mu$ M), livre e/ou incorporada no LUV, a C13 inibiu cerca de 50% da capacidade do neutrófilo de oxidar o TMB pela taurina-cloramina, cerca de 60% da capacidade das células de liberar a enzima elastase e cerca de 40% do processo de formação e liberação das NETs de neutrófilos periféricos de pacientes com AR. Em condições de cultura, a C13 não interferiu na viabilidade de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com AR, permanecendo essa porcentagem em torno de 80% para todos os tratamentos realizados durante as 18 horas. No entanto, na concentração de 20  $\mu$ M, modulou os estágios de morte das células, reduzindo a porcentagem de neutrófilos em apoptose e aumentando a porcentagem de células em necrose, em relação ao controle (DMSO 01%) (ver figura 6.1).

A capacidade de inibir a desgranulação da enzima elastase e de impedir a formação e a liberação das NETs, associada com a capacidade da mesma de modular negativamente o metabolismo oxidativo, sem interferir na viabilidade celular, indica que a C13 possa ser aplicada como protótipo de um agente terapêutico adjuvante ao tratamento convencional de pacientes com artrite reumatoide.



**Figura 6.1:** Esquema representativo do efeito imunomodulador do Derivado 3- fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilendioxifenil]-cumarina (C13) em neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide, estimulados via FC $\gamma$ R e CR. Para maiores detalhes ver conclusão. Figura adaptada de: Mocsai, 2013.

## **REFERÊNCIAS**

ABE, T.; TAKEUCHI, T. Rheumatoid arthritis and tumor necrosis factor alpha. **Autoimmunity**, v. 34, n. 4, p. 291-303, 2001. ISSN 0891-6934. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174037500008 >.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680-689, Oct 2010. ISSN 0367-326X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282864800002 >.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, Feb 2013. ISSN 1556-276X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316359300001 >.

ALEMAN, O. R. et al. Differential Use of Human Neutrophil Fc gamma Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Journal of Immunology Research**, 2016. ISSN 2314-8861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000368838700001 >.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, Jan 2013. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315547400008 >.

ALVES, C. M. et al. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**, v. 27, n. 6, p. 701-8, Jun 2008. ISSN 0770-3198. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17955277 >.

AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, Vol 30, v. 30, p. 459-489, 2012. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000304198100019 >.

ANDRADE, M. F. et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 387-394, Feb 2013. ISSN 1567-5769. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316769700027 >.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988. ISSN 0004-3591. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796 >.

ASCHERMANN, S. et al. The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 2, p. 161-167, May 2010. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276499400003 >.

BALLANTI, E. et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: Relationship with anti-TNF inhibitors. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 10, p. 617-623, Aug 2011. ISSN 1568-9972. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295347400008 >.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P. et al. Leukotriene B-4 inhibits neutrophil apoptosis via NADPH oxidase activity: Redox control of NF-kappa B pathway and mitochondrial stability.

**Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 10, p. 1990-1997, Oct 2012. ISSN 0167-4889. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309494300034 >.

BARDOEL, B. W. et al. The Balancing Act of Neutrophils. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 5, p. 526-536, May 2014. ISSN 1931-3128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335914300006 >.

BARRINGTON, R. et al. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 180, p. 5-15, Apr 2001. ISSN 0105-2896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169079000001 >.

BATZRI, S.; KORIN, E. D. Interaction of phospholipids vesicles with cells- endocytosis and fusion as alternate mechanism for uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 621-34, 1975.

BEHNEN, M. et al. Immobilized Immune Complexes Induce Neutrophil Extracellular Trap Release by Human Neutrophil Granulocytes via Fc gamma RIIIB and Mac-1. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1954-1965, Aug 2014. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000341139300045 >.

BELOSTOCKI, K. et al. Fc gamma RIIa is a target for modulation by TNF alpha in human neutrophils. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 78-86, Oct 2005. ISSN 1521-6616. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231942600012 >.

BEYER, G.; MELZIG, M. F. Effects of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells and on neutrophil elastase activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1183-1186, Jul 2005. ISSN 0918-6158. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230464900009 >.

BIANCHI, M. et al. Restoration of Net Formation by Gene Therapy in CGD Controls Aspergillosis. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 295-295, May 2010. ISSN 1521-6616. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277112900041 >.

BLACKBURN, W. D.; HECK, L. W.; WALLACE, R. W. THE BIOFLAVONOID QUERCETIN INHIBITS NEUTROPHIL DEGRANULATION, SUPEROXIDE PRODUCTION, AND THE PHOSPHORYLATION OF SPECIFIC NEUTROPHIL PROTEINS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 144, n. 3, p. 1229-1236, May 1987. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987H337800018 >.

BOER, K. et al. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 16-17, p. 1351-1355, Nov 2010. ISSN 0009-9120. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000283041500015 >.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, Nov 2010. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286082600006 >.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1017-1025, Nov 2014. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343640700007 >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, Mar 2004. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220000100047 >.

BRUHNS, P. et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3716-3725, Apr 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265445900012 >.

BUGL, S. et al. Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. **Blood**, v. 121, n. 5, p. 723-733, Jan 2013. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314867200005 >.

CAMOUS, L. et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1340-1349, Jan 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286623400033 >.

CANTAERT, T. et al. Presence and Role of AntiCitruinated Protein Antibodies in Experimental Arthritis Models. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 4, p. 939-948, Apr 2013. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316962000012 >.

CARROLL, M. V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 12, p. 965-975, Sep 2011. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295861600002 >.

CARVALHO, C. A. **Modulação do apoptose de neutrófilos humanos em cultura pela galangina e 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina**. 84f (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

CARVALHO, L. O. et al. The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 9, p. 1831-1836, Sep 2015. ISSN 0730-2312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358506300003 >.

CASCAO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 8, p. 531-535, Jun 2010. ISSN 1568-9972. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279554600002 >.

CASSATELLA, M. A.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Never Underestimate the Power of a Neutrophil. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 698-700, Nov 2009. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272097900003 >.

CHRISTEN, U.; VON HERRATH, M. G. Infections and autoimmunity - Good or bad? **Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7481-7486, Jun 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229791400003 >.

CLARK, A. J.; PETTY, H. R. A cell permeant peptide containing the cytoplasmic tail sequence of Fc receptor type IIA reduces calcium signaling and phagolysosome formation in neutrophils.

**Cellular Immunology**, v. 261, n. 2, p. 153-158, 2010. ISSN 0008-8749. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274706400011 >.

CORVO, M. L. et al. Superoxide dismutase entrapped in long-circulating liposomes: formulation design and therapeutic activity in rat adjuvant arthritis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1564, n. 1, p. 227-236, Aug 2002. ISSN 0005-2736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176896700030 >.

COSTA, M. F. et al. Eugenia aurata and Eugenia punicifolia HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, Oct 2016. ISSN 1472-6882. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000386082200004 >.

DAI, X. L. et al. Differential signal transduction, membrane trafficking, and immune effector functions mediated by Fc gamma RI versus Fc gamma RIIa. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 318-327, Jul 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268061700017 >.

DANG, Y. et al. The role of the neutrophil Fc gamma receptor I (CD64) index in diagnosing spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 154-160, Aug 2016. ISSN 1201-9712. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000380806600025 >.

DAY, R. B.; LINK, D. C. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 9, p. 1415-1423, May 2012. ISSN 1420-682X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303408800002 >.

DE MARCHI, A. A. et al. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4823-4833, Sep 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223845300007 >.

DE OLIVEIRA, E. B. et al. The Human NADPH Oxidase: Primary and Secondary Defects Impairing the Respiratory Burst Function and the Microbicidal Ability of Phagocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 420-427, May 2011. ISSN 0300-9475. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288799200004 >.

DEMKOWICZ, S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Fluorinated 3-Phenylcoumarin-7-O-Sulfamate Derivatives as Steroid Sulfatase Inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 87, n. 2, p. 233-238, Feb 2016. ISSN 1747-0277. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000370485300008 >.

DRABIKOVA, K. et al. Study of Possible Mechanisms Involved in the Inhibitory Effects of Coumarin Derivatives on Neutrophil Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013. ISSN 1942-0900. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327636900001 >.

EDWARDS, S. H. R. et al. Biodistribution and clearance of intra-articular Liposomes in a large animal model using a radiographic marker. **Journal of Liposome Research**, v. 17, n. 3-4, p. 249-261, 2007. ISSN 0898-2104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251089100014 >.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 3, p. 279-289, Jul 2008. ISSN 1863-2297. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257492900007 >.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; PERIANIN, A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 778-785, Sep 2010. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280692800002 >.

FAHEY, J. L.; MISHELL, R.; WUNDERLICH, J. IMMUNOGLOBULINS OF MICE .1. 4 MAJOR CLASSES OF IMMUNOGLOBULINS - 7S GAMMA2- 7S GAMMA1- GAMMA1A (BETA2A)- + 18S GAMMA1M-GLOBULINS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 120, n. 2, p. 223-&, 1964. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19644850B00002 >.

FAIRHURST, A. M. et al. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 2, 2007. ISSN 1478-6354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247647900016 >.

FERINO, G. et al. MAO Inhibitory Activity of 2-Arylbenzofurans versus 3-Arylcoumarins: Synthesis, invitro Study, and Docking Calculations. **Chemmedchem**, v. 8, n. 6, p. 956-966, Jun 2013. ISSN 1860-7179. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319416800012 >.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 3ed. New York: **John Wiley & Sons**, 1994.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231-241, Jan 2007. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243665800012 >.

FUCHS, T. A.; BRILL, A.; WAGNER, D. D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis Tobias. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 32, n. 8, p. 1777-1783, Aug 2012. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306558100014 >.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MOCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1185-1197, Dec 2013. ISSN 1567-5769. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329378800026 >.

GABRIEL, C. et al. Leishmania donovani Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4319-4327, Oct 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282059500059 >.

GAUTAM, S. et al. Roscovitine-induced Apoptosis in Neutrophils and Neutrophil Progenitors Is Regulated by the Bcl-2-Family Members Bim, Puma, Noxa and Mcl-1. **Plos One**, v. 8, n. 11, Nov 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326499300076 >.

GEERING, B.; SIMON, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 9, p. 1457-1469, Sep 2011. ISSN 1350-9047. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293998100009 >.

GHARIB, R. et al. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 175-186, Sep 2015. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356746000023 >.

GORMAN, J. D.; CRISWELL, L. A. The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 59-+, Feb 2002. ISSN 0889-857X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173581000005 >.

GRAYSON, P. C.; KAPLAN, M. J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 2, p. 253-264, Feb 2016. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000371890400005 >.

GRIGORIEVA, D. V. et al. Myeloperoxidase Stimulates Neutrophil Degranulation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 161, n. 4, p. 495-500, Aug 2016. ISSN 0007-4888. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000383040200012 >.

HAGFORS, L. et al. Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition Journal**, v. 2, 2003. ISSN 1475-2891. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000209481700005 >.

HAHN, J. et al. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 34, n. 4, p. S6-S8, Jul-Aug 2016. ISSN 0392-856X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000383928000003 >.

HATTORI, H. et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3546-3551, Feb 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275130900050 >.

HENSON, P. M. IMMUNOLOGIC RELEASE OF CONSTITUENTS FROM NEUTROPHIL LEUKOCYTES .2. MECHANISMS OF RELEASE DURING PHAGOCYTOSIS, AND ADHERENCE TO NONPHAGOCYTOSABLE SURFACES. **Journal of Immunology**, v. 107, n. 6, p. 1547-&, 1971. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1971L121400006 >.

HEPBURN, A. L.; MASON, J. C.; DAVIES, K. A. Expression of Fc gamma and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 43, n. 5, p. 547-554, May 2004. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221297900002 >.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, n. 6, p. 265-278, 2004. ISSN 1478-6354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225160100004 >.

HUANG, Z. Y. et al. Interaction of Two Phagocytic Host Defense Systems Fc gamma RECEPTORS AND COMPLEMENT RECEPTOR 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 160-168, Jan 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285782800017 >.

HUONG, T. M. et al. The complement system enhances the clearance of phosphatidylserine (PS)-liposomes in rat and guinea pig. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 197-205, Mar 2001. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167511600020 >.

IOAN-FACSINAY, A. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 1, p. 188-193, Jan 2011. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285381100033 >.

JAKUS, Z. et al. Critical role of phospholipase C gamma 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 3, p. 577-593, Mar 2009. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266009200009 >.

JANCINOVA, V. et al. The natural stilbenoid pinosylvin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 10, p. 1285-1292, Oct 2012. ISSN 1671-4083. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309656500007 >.

Jl, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 157-168, Feb 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174039600001 >.

JIE, H. Y. et al. Necrostatin-1 enhances the resolution of inflammation by specifically inducing neutrophil apoptosis. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19367-19381, Apr 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000375804000024 >.

JOHANSSON, S. et al. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 32-41, Jan 2002. ISSN 0163-3864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173618200009 >.

JOHNSTONE, A. THORPE, R. *Immunochemistry in practice*. 2a. ed. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, 1987.

JOVANOVIC, V. et al. Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 12, n. 4, p. 293-298, 2009. ISSN 1756-1841. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272127900005 >.

KABEYA, L. M. et al. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenyleoumarin derivatives: Synthesis and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1516-1524, Feb 2007. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243959100029 >.

KABEYA, L. M. et al. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**. 2002; 111(1-4): 103-13.

\_\_\_\_\_. Antioxidant activity and cytotoxicity as mediators of the neutrophil chemiluminescence inhibition by butylated hydroxytoluene. **Pharmazie**, v. 63, n. 1, p. 67-70, Jan 2008. ISSN 0031-7144. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252418600015 >.

\_\_\_\_\_. Arylcoumarin derivatives inhibitory effect in peroxidase-catalyzed reactive oxygen species generation: structure-activity relationships. **Free Radical Research**, v. 40, p. S169-S169, 2006. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240656000537 >.

KANASHIRO, A. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 1, p. 61-65, Jan 2004. ISSN 0951-418X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188733900012 >.

\_\_\_\_\_. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: Importance of the catechol group. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, v. 62, n. 5-6, p. 357-361, May-Jun 2007. ISSN 0939-5075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248400100008 >.

KAPOOR, B. et al. Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis. **Scientific World Journal**, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000331319000001 >.

KARN, P. R.; CHO, W.; HWANG, S. J. Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. **Nanomedicine**, v. 8, n. 9, p. 1529-1548, Sep 2013. ISSN 1743-5889. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330528600019 >.

KAWAKAMI, E. et al. The histone demethylase Fbx11/Kdm2a plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. **Mechanisms of Development**, v. 135, p. 31-42, Feb 2015. ISSN 0925-4773. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000348033900003 >.

KELKKA, T. et al. Reactive Oxygen Species Deficiency Induces Autoimmunity with Type 1 Interferon Signature. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 16, p. 2231-2245, Dec 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000349634000004 >.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, Mar 2009. ISSN 0257-277X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264597400004 >.

KESHARI, R. S. et al. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 532-540, Mar 2013. ISSN 0730-2312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000313900600006 >.

KHANDPUR, R. et al. NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 178, Mar 2013. ISSN 1946-6234. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316795300004 >.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 5, p. 761-772, Feb 2009. ISSN 0161-5890. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263942200002 >.

KIM, W. U. et al. Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen - A novel treatment strategy for induction of oral tolerance. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 4, p. 1109-1120, Apr 2002. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174946500034 >.

KIRCHNER, T. et al. The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **Mediators of Inflammation**, 2012. ISSN 0962-9351. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302655700001 >.

KLUTER, T. et al. The Antimicrobial Peptide Lysozyme Is Induced after Multiple Trauma. **Mediators of Inflammation**, 2014. ISSN 0962-9351. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000344170500001 >.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309-333, Nov-Dec 2009. ISSN 1939-5094. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000283710600004 >.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, Mar 2013. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316616100009 >.

KOVACS, M. et al. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 1993-2011, Sep 2014. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342744800009 >.

KRAAIJ, T. et al. A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 6, p. 577-584, Jun 2016. ISSN 1568-9972. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000375499700012 >.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 3, Mar 2015. ISSN 1553-7366. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000352201900003 >.

KRUMBHOLZ, M. et al. BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 4, p. 298-302, Dec 2005. ISSN 0896-8411. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234157800007 >.

KUNDU, S. et al. Attenuation of oxidative stress by Allylpyrocatechol in synovial cellular infiltrate of patients with Rheumatoid Arthritis. **Free Radical Research**, v. 45, n. 5, p. 518-526, May 2011. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288390500003 >.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. **Free Radical Research**, v. 46, n. 12, p. 1482-1489, Dec 2012. ISSN 1071-5762. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000310616800006 >.

KUSTIAWAN, I.; DERKSEN, N.; RISPENS, T. Inactivated pepsin inhibits neutrophil activation by Fcγ-receptor-dependent and independent stimuli. **Clinical Immunology**, v. 169, p. 85-88, Aug 2016. ISSN 1521-6616. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000381245100011 >.

LAEMMLI, U. K. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1970H022600020 >.

LAMBETH, J. D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181-189, Mar 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000189345200012 >.

LANDI-LIBRANDI, A. P. et al. Study of quercetin-loaded liposomes as potential drug carriers: in vitro evaluation of human complement activation. **Journal of Liposome Research**, v. 22, n. 2, p. 89-99, Jun 2012. ISSN 0898-2104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000304098300001 >.

\_\_\_\_\_. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP--H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>--luminol system. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 4, p. 258-267, 2011. ISSN 0265-2048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290316200004 >.

LELIEFELD, P. H. C. et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Critical Care**, v. 20, Mar 2016. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000372786300001 >.

LIAO, H. R. et al. The anti-inflammatory effect of 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol by targeting Lyn kinase in human neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 236, p. 90-101, Jul 2015. ISSN 0009-2797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356743200012 >.

LU, J. H. et al. Crystal Structure of Fc gamma Receptor I and Its Implication in High Affinity gamma-Immunoglobulin Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40608-40613, Nov 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297315400021 >.

LUAN, Y. Y. et al. Insights into the Apoptotic Death of Immune Cells in Sepsis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 35, n. 1, p. 17-22, Jan 2015. ISSN 1079-9907. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000351275300002 >.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. LYSOSOMAL-ENZYME RELEASE FROM POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES INDUCED BY IMMUNE-COMPLEXES OF IGM AND OF IGG. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 4, p. 2015-2020, 1984. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984SJ29300067 >.

LUCISANO-VALIM, Y. M. et al. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 47, n. 1, p. 53-58, Jan-Feb 2002. ISSN 1056-8719. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178975200007 >.

LUERMAN, G. C. et al. Application of proteomics to neutrophil biology. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 3, p. 552-561, Jan 2010. ISSN 1874-3919. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274552400019 >.

LUX, A. et al. The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, p. 92-96, Jan 2010. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272737400017 >.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, Aug 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293069600011 >.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M. et al. Fc gamma and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 11, n. 4, p. 240-248, 2002. ISSN 0961-2033. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175727200008 >.

MATOS, M. J. et al. Synthesis and Study of a Series of 3-Arylcoumarins as Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7127-7137, Oct 2011. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296205900009 >.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 9**, v. 9, p. 181-218, 2014. ISSN 1553-4006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000336055900009 >.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, Jun 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000357154800003 >.

METZLER, K. D. et al. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. **Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 883-896, Aug 2014. ISSN 2211-1247. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000341572200023 >.

MEYER-HOFFERT, U.; WINGERTSZAHN, J.; WIEDOW, O. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. **Journal of**

**Investigative Dermatology**, v. 123, n. 2, Aug 2004. ISSN 0022-202X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222483400250 >.

MOCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 7, p. 1283-1299, Jul 2013. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320860700001 >.

MOCSAI, A.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 387-402, Jun 2010. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277990100010 >.

MOHAMMED, B. M. et al. Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 3131-3150, Aug 2013. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330521800016 >.

MOREIRA, M. R. et al. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, v. 81, n. 4, p. 317-326, Jul 2007. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248683100007 >.

MOULDING, D. A.; HART, C. A.; EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil Fc gamma RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 6, p. 875-882, Jun 1999. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080881600023 >.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88-102, Oct 2007. ISSN 0105-2896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249429500008 >.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, n. 7, p. 602-611, Jul 2014. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337715600006 >.

NEMETH, T.; MOCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-19, Mar 2012. ISSN 0165-2478. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303136700003 >.

NGUYEN-JACKSON, H. et al. STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. **Journal of Immunology**, v. 184, Apr 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000209758303229 >.

NICOLETTI, I. et al. A RAPID AND SIMPLE METHOD FOR MEASURING THYMOCYTE APOPTOSIS BY PROPIDIUM IODIDE STAINING AND FLOW-CYTOMETRY. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, Jun 1991. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FQ60900014 >.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, Dec 2013. ISSN 0167-4889. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329596200088 >.

NISHINAKA, Y. et al. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 1, p. 75-79, Sep 2011. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295395000014 >.

NKENGFAK, A. E. et al. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 855-856, Jun 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087922900030 >.

O'BRIEN, X. M. et al. Lectin Site Ligation of CR3 Induces Conformational Changes and Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 5, p. 3337-3348, Jan 2012. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300295100039 >.

O'DELL, J. The state-of-the-art in treating rheumatoid arthritis. **Scottish Medical Journal**, v. 60, n. 3, p. 117-118, Aug 2015. ISSN 0036-9330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359164200053 >.

O'SHEA, J. J.; LAURENCE, A.; MCINNES, I. B. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 3, p. 173-182, Mar 2013. ISSN 1759-4790. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316239800006 >.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; HOLDSWORTH, S. R. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. **Journal of Immunology Research**, 2016. ISSN 2314-8861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000369262800001 >.

OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F. B. T. Preparation of 100nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine, using ethanol injection method. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 133, p. 69-78, 2005.

OLMEDO, D. et al. 3-Phenylcoumarins as Inhibitors of HIV-1 Replication. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9245-9257, Aug 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308211100039 >.

OUCHTERLONY, O. DIFFUSION-IN-GEL METHODS FOR IMMUNOLOGICAL ANALYSIS. **Progress in Allergy**, v. 5, p. 1-78, 1958. ISSN 0079-6034. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1958WN00700002 >.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, Feb 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000331289900012 >.

PALMER, L. J. et al. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 261-268, Feb 2012. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000299037700010 >.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Activation of complement alternative pathway in rheumatoid arthritis: implications in peripheral neutrophils functions. **Open Autoimmun J.** 2011; 3: 1-9.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: Comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fc gamma receptor expression. **Journal of Immunological Methods**, v. 412, p. 70-77, Oct 2014. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000345056200007 >.

\_\_\_\_\_. Fc gamma and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. ISSN 1741-427X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359572800001 >.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677-691, Nov 2010. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284135700021 >.

PATIL, P. O. et al. A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 2434-2450, May 2013. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000317403200001 >.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, Oct 2015. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000363002300011 >.

PHILLIPS, D. C. et al. Aberrant Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generation in Rheumatoid Arthritis (RA): Causes and Consequences for Immune Function, Cell Survival, and Therapeutic Intervention. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 6, p. 743-785, Mar 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275049500005 >.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, Jul 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088562000038 >.

PILSCZEK, F. H. et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 12, p. 7413-7425, Dec 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284878700038 >.

PINCETIC, A. et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 15, n. 8, p. 707-716, Aug 2014. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000339323000006 >.

PLIYEV, B. K.; MENSNIKOV, M. Differential effects of the autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine on spontaneous and TNF-alpha-induced neutrophil apoptosis.

**Apoptosis**, v. 17, n. 10, p. 1050-1065, Oct 2012. ISSN 1360-8185. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308252200003 >.

POLLONO, E. N. et al. A systematic review of the effect of TNF-alpha antagonists on lipid profiles in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 9, p. 947-955, Sep 2010. ISSN 0770-3198. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280241100001 >.

POMIRLEANU, C. et al. A predictive model for remission and low disease activity in patients with established rheumatoid arthritis receiving TNF blockers. **Clinical Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 665-670, May 2013. ISSN 0770-3198. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319459200019 >.

POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166-180, Mar 2014. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000332019100012 >.

PREYNAT-SEAUVE, O. et al. An interaction between CD16 and CR3 enhances iC3b binding to CR3 but is lost during differentiation of monocytes into dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 147-155, Jan 2004. ISSN 0014-2980. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188412400016 >.

PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 187, n. 1, p. 68-73, Jun 2013. ISSN 1569-9048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320208800012 >.

PRUCHNIAK, M. P.; KOTULA, I.; MANDA-HANDZLIK, A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. **Central European Journal of Immunology**, v. 40, n. 2, p. 217-224, 2015. ISSN 1426-3912. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358822600014 >.

RADSTAKE, T. et al. The functional variant of the inhibitory Fc gamma receptor IIb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 12, p. 3828-3837, Dec 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242780700015 >.

RAMSLAND, P. A. et al. Structural Basis for Fc gamma RIIa Recognition of Human IgG and Formation of Inflammatory Signaling Complexes. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 6, p. 3208-3217, Sep 2011. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295034200039 >.

REEVES, E. P. et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 291-297, Mar 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174482200034 >.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251155400048 >.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, Sep 2010. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281115500006 >.

ROSS, G. D. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. **Immunologic Research**, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2002. ISSN 0257-277X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175180300003 >.

ROSSI, A.; LORD, J. M. Adiponectin inhibits neutrophil apoptosis via activation of AMP kinase, PKB and ERK 1/2 MAP kinase. **Apoptosis**, v. 18, n. 12, p. 1469-1480, Dec 2013. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326925900002 >.

ROSSI, A. G. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis (vol 12, pg 1056, 2006). **Nature Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1434-1434, Dec 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242618200026 >.

ROUSSAKI, M. et al. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 13, p. 3889-3892, Jul 2010. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278644700012 >.

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S. et al. Neutrophils from Brazilian patients with Graves' disease: some biochemical and functional aspects. **Cell Biochemistry and Function**, v. 23, n. 5, p. 297-306, Sep-Oct 2005. ISSN 0263-6484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232049900001 >.

SAKAI, J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1037-1049, Dec 2012. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312575000012 >.

SANGALETTI, S. et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3007-3018, Oct 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311619300018 >.

SANTOS, M. D. et al. In situ screening of 3-arylcoumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 6, p. 731-738, Jun 2013. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000320003700009 >.

SASHIDHARA, K. V. et al. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 1937-1941, Apr 2011. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288245100006 >.

\_\_\_\_\_. Synthesis and evaluation of new 3-phenylcoumarin derivatives as potential antidepressant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 20, p. 4876-4880, Oct 2014. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342575200021 >.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 515-521, May 2014. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335710700022 >.

SEBE-PEDROS, A. et al. Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 22, p. 10142-10147, Jun 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278246000044 >.

SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 3, p. 359-372, Mar 2011. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287807700007 >.

SELMI, C. et al. New treatments for inflammatory rheumatic disease. **Immunologic Research**, v. 60, n. 2-3, p. 277-288, Dec 2014. ISSN 0257-277X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000346412300017 >.

SHAFFU, S. et al. Self-assessment of 28-joint disease activity scores by patients with rheumatoid arthritis on anti-TNF therapy. **Rheumatology**, v. 52, n. 3, p. 576-578, Mar 2013. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315122200027 >.

SHOENFELD, Y. Infections and autoimmunity - friends or foe? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 27, n. 5, p. 716-716, Sep-Oct 2009. ISSN 0392-856X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272278400043 >.

SIMOES, S. I. et al. Developments in the rat adjuvant arthritis model and its use in therapeutic evaluation of novel non-invasive treatment by SOD in Transfersomes. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 2, p. 419-434, Mar 2005. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228025900011 >.

SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 1, p. 3-15, Jan 2016. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000366402400043 >.

STAPELS, D. A. C.; GEISBRECHT, B. V.; ROOIJAKKERS, S. H. M. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 42-48, Feb 2015. ISSN 1369-5274. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000349879800008 >.

STRYDOM, N.; RANKIN, S. M. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 4, p. 304-314, 2013. ISSN 1662-811X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320682100002 >.

SURMIAK, M.; SANAK, M. Different forms of alpha-1 antitrypsin and neutrophil activation mediated by human anti-PR3 IgG antibodies. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1276-1284, 2016. ISSN 1734-1140. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000388432100024 >.

SVINYAROV, I.; BOGDANOV, M. G. One-pot synthesis and radical scavenging activity of novel polyhydroxylated 3-arylcoumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78,

p. 198-206, May 2014. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335805400020 >.

TAKAYANAGI, H. New developments in osteoimmunology. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 11, p. 684-689, Nov 2012. ISSN 1759-4790. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310792500011 >.

TAWATA, M. et al. ANTIPLATETLET ACTION OF GU-7, A 3-ARYLCOUMARIN DERIVATIVE, PURIFIED FROM GLYCYRRHIZAE RADIX. **Planta Medica**, v. 56, n. 3, p. 259-263, Jun 1990. ISSN 0032-0943. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DK71300003 >.

TITOVA, E. et al. Neutrophil CD64 Expression as a Diagnostic Marker in Patients Hospitalized with Exacerbations of COPD: A Prospective Observational Study. **Lung**, v. 193, n. 5, p. 717-724, Oct 2015. ISSN 0341-2040. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000361820800012 >.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, Feb 2005. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226721500020 >.

TUNALI, T. et al. 6,7-dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. **British Journal of Haematology**, v. 126, n. 2, p. 226-230, Jul 2004. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222356200008 >.

VAN ACKER, S. et al. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 935-943, Oct 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000076222900003 >.

VAN DER POEL, C. E. et al. Functional Characteristics of the High Affinity IgG Receptor, Fc gamma RI. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 2699-2704, Mar 2011. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287356900003 >.

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, Nov 2009. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270829600015 >.

VAN DYKE, K., CASTRANOVA, V. Cellular chemiluminescence. Vol.1. Boca Raton: **CRC Press**, 1987.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-190, Sep 2000. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089562500014 >.

VIRYASOVA, G. M. et al. Effects of phosphodiester and phosphorothioate ODN2216 on leukotriene synthesis in human neutrophils and neutrophil apoptosis. **Biochimie**, v. 125, p. 140-149, Jun 2016. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000376811400016 >.

VOROBEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 208-219, Feb 2016. ISSN 0171-2985. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000369046700012 >.

VUOTTO, M. L. et al. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 399-405, Mar 2003. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182414200017 >.

WANG, J.; ARASE, H. Regulation of immune responses by neutrophils. **Year in Immunology: Myeloid Cells and Inflammation**, v. 1319, p. 66-81, 2014. ISSN 0077-8923. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000338098700006 >.

WANG, Y. et al. ADAM17 Activity and Other Mechanisms of Soluble L-selectin Production during Death Receptor-Induced Leukocyte Apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 8, p. 4447-4454, Apr 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276625800046 >.

WEIR, D. M. Immunochemistry and molecular immunology. 5ed. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, p. 570, 1986.

WHITLOCK, B. B. et al. Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of Akt and ERK survival mechanisms. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 6, p. 1305-1320, Dec 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000165851300019 >.

WILLEMZE, A. et al. New biomarkers in rheumatoid arthritis. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 70, n. 9, p. 392-399, Nov 2012. ISSN 0300-2977. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314405500002 >.

WOEBER, K. A.; INGBAR, S. H. METABOLISM OF L-THYROXINE BY PHAGOCYTOSING HUMAN LEUKOCYTES. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 8, p. 1796-1803, 1973. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1973Q387600002 >.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, Sep 2010. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280904400004 >.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 593-601, Oct 2014. ISSN 1759-4790. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342964700004 >.

XIA, Y. et al. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6417-6426, Dec 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179478400042 >.

YANG, D. et al. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 531-538, Nov 2009. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271923500004 >.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, n. 2, p. 112-119, Jun 2011. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292018600006 >.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 3, p. 277-284, 2013. ISSN 0001-527X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000325237000002 >.

ZHANG, D. C. et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 528+, Sep 2015. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000361599900052 >.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Farmagnosia: da planta ao medicamento. 5. Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

**ANEXOS**

ANEXO I – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 02 de março de 2016

Ofício nº 714/2016  
CEP/MGV

**Prezadas Senhoras,**

O trabalho intitulado “**MODULAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE POR 6,7-DIIDROXI-3-[3,4-METILENODIAXIFENIL]-CUMARINA, INCORPORADA EM LIPOSSOMAS**” – versão 2, de 19/11/2015, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 422ª Reunião Ordinária, realizada em 29/02/2016 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como os **Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, de 11/12/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 15038/2015.

*De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.*

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.*

*Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.*

Atenciosamente.

**DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**

Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

**LUCINEIA REUSE ALBIERO**

**PROFª.DRª. YARA MARIA LUCISANO VALIM(Orientadora)**

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

---

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Campus Universitário – Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto - SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440  
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

**ANEXO II - Parecer do Comitê de ética da Instituição proponente (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo)**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
*Comitê de Ética em Pesquisa*

Ribeirão Preto, 24 de março de 2016.

**Projeto de pesquisa:** "MODULAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE POR 6,7-DIIDROXI-3-[3,4-METILENODIOXIFENIL]-CUMARINA, INCORPORADA EM LIPOSSOMAS".

**Pesquisador Responsável:** LUCINEIA REUSE ALBIERO

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

"O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 446/12. Diante disso, a FCFRP-USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

  
Cleni Mara Marzocchi Machado  
Coordenadora do CEP/FCFRP

  
Maria Vitória Lopes Bádra Bentley  
Diretora da FCFRP/USP

## ANEXO III – Certificado de aprovação da comissão de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

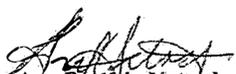


### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Modulação funcional de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide por 6,7-diidroxí-3-[3’4’-merilenodioxifenil]-cumarina, incorporada em lipossomas”, protocolo nº 15.1.1163.60.0, sob a responsabilidade de Lucinéia Reuse Albiero e da Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na data de 12/04/2016.

Vigência do Projeto	01/02/2016 a 02/02/2017
Espécie/Linhagem	Cochão <i>New Zealand white</i>
Nº de animais	04
Peso/Idade	2,5 kg
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central USP RP

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2016.

  
Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui  
Presidente da CEUA-FCFRP