



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio**

**Nathália Cristina Canicoba**

**Ribeirão Preto**  
**2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio”

Nathália Cristina Canicoba

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

**Orientada:** Nathália Cristina Canicoba

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado

Ribeirão Preto

2016

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.

Canicoba, Nathália Cristina

Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para interações com o endotélio. Ribeirão Preto, 2016.

102 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Marzocchi-Machado, Cleni Mara

1. Neutrófilos. 2. CR3. 3. Mieloperoxidase.4. Endotélio.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Cristina Canicoba

Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovada em : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedicatória*

**Dedico este trabalho à minha família. A minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, pelo apoio, amor e carinho que sempre recebi ao longo de minha vida.**

*Agradecimientos*



Agradeço a **Deus**, por toda força, sabedoria e paciência para enfrentar todos os desafios encontrados ao longo da minha vida pessoal e acadêmica;

à minha amada **Mãe, Vera Lúcia Canicoba**, que mesmo não estando mais ao meu lado, está sempre comigo em espírito me ajudando a superar meus desafios. Ela foi e sempre será um dos maiores exemplos em minha vida de perseverança, amor e bondade;

ao meu querido **Pai, Adil Fernandes Canicoba**, o homem mais doce e amável que posso ter como exemplo. Que mesmo após o falecimento da minha mãe não se deixou abalar e hoje está vivendo uma nova vida e sendo feliz. Ele é o meu maior exemplo de bravura e tenho muito orgulho em dizer que é a pessoa que procuro me espelhar;

ao meu **irmão, Arnaldo Henrique Canicoba**, o irmão mais alegre e carinhoso que poderia desejar. Sempre ao meu lado me apoiando, nos momentos bons e ruins. Sempre de bom humor, ele me ensinou a sempre olhar o lado positivo das situações e a não se deixar abater por nada;

à Profa. Dra. **Cleni Mara Marzocchi Machado**, pela oportunidade e por tudo que me ensinou, sempre sendo carinhosa, paciente e sempre me tratando com muito respeito;

aos meus **amigos** de laboratório, **Juliana, Gisele, Carlos, Leandro e Brunapelos** conselhos, apoio, bom humor e ajuda durante a minha caminhada;

aos **voluntários da pesquisa**, pela disponibilidade e boa vontade em colaborar com meu projeto;

à farmacêutica-bioquímica **Jennifer Michiko Chauca Yokoya**, pela amizade e, sobretudo, pela ajuda durante essa minha caminhada;

ao Prof. Dr. **Sérgio Akira Uyemura**, do Depto de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para o uso do fotodocumentador e do citômetro;

à farmacêutica-bioquímica **Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini**, Depto.de Física e Química da FCFRP-USP, pela colaboração com este trabalho;

à biomédica **Fabiana Rossetto de Moraes**, FCFRP-USP, pela ajuda com as leituras no citômetro de fluxo;

às minhas amigas que me acolheram em Ribeirão Preto, **Eloá Bassi**, **Alessandra Messias**, **Mariana Simpronio** e **Mônia Lemos**, pelo carinho e companheirismo;

aos **professores** do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP por auxiliarem meu aprendizado e crescimento acadêmico;

aos **coordenadores** e **funcionários** do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pela disposição em ajudar sempre que necessário;

à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP**, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**) pela concessão da bolsa de mestrado;

a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Επίγραφε*

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

CANICOBA, N. C. **Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio.** 2016. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O neutrófilo é o leucócito predominante na circulação sanguínea. Por ser um fagócito profissional e conter grânulos ricos em enzimas digestivas, ele representa a primeira linha de defesa contra infecções. A principal proteína dos seus grânulos é a mieloperoxidase (MPO), a qual contribui para a atividade microbicida do neutrófilo por mediar a geração de moléculas oxidantes que degradam inúmeras estruturas biológicas dos patógenos, mas que podem também agredir o próprio hospedeiro. A ação deletéria da MPO está relacionada com processos inflamatórios que causam danos ao endotélio e sustentam a inflamação. A liberação da MPO do neutrófilo diretamente sobre o endotélio depende da interação célula-célula mediada pela integrina CD11b/CD18 (receptor tipo 3 para o complemento, CR3) expressa nos neutrófilos e pela molécula de adesão intercelular (ICAM-1) no endotélio, sugerindo o envolvimento do CR3 em no dano tecidual na inflamação crônica. Um polimorfismo no gene ITGAM (*integrin, alpha M*), que codifica a integrina CD11b ( $\alpha M$ ) do CR3 influencia a interação do CR3 com seus ligantes e prejudica a adesão celular. Há poucos estudos funcionais sobre esta variante, sendo a maioria em células transfectadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as implicações da variante da cadeia CD11b do CR3 para as interações neutrófilo-endotélio. Os genótipos para identificação das variantes alélicas foram determinados por reação em cadeia da polimerase; as células endoteliais (CE) extraídas da veia do cordão umbilical foram expostas aos neutrófilos expressando as variantes 77R e 77H, os quais foram estimulados ou não com Zimosan, imunocomplexos com F(ab')<sub>2</sub> – ambos opsonizados com soro humano normal (SHN) e tratados com soro humano inativado (SHI) – e o formil-metil-leucil-fenilalanina (fMLP); a agressão às CE foi avaliada por medida da peroxidação lipídica pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; a transferência de MPO dos neutrófilos para as CE foi analisada por citometria de fluxo com anticorpo monoclonal específico; a avaliação da ativação endotelial foi avaliada pela liberação de ICAM-1 por ensaio imunoenzimático. Os resultados mostraram que i) os neutrófilos com a variante 77H, sem estímulos, causaram maior agressão ao endotélio, com maior peroxidação lipídica, quando comparada àquela de neutrófilos com a variante 77R; ii) a peroxidação lipídica foi maior quando os neutrófilos responderam aos estímulos opsonizados com SHN; iii) os neutrófilos com a variante 77R produziram maior peroxidação lipídica com o estímulo F(ab')<sub>2</sub>/SHN comparados aos neutrófilos com 77H; iv) a transferência de MPO para as células endoteliais é dependente da disponibilidade do CR3 e do contato com o neutrófilo; v) os estímulos dependentes do CR3 promoveram um aumento da ativação endotelial medida pela concentração de ICAM-1 solúvel; a remoção do complemento (SHI) minimiza esta ativação; vi) o modelo permitiu observar a dependência do CR3 para todas as funções estudadas. Os resultados refletem a diversidade de mecanismos envolvidos nas interações estudadas e apontam para a necessidade do refinamento dos modelos experimentais para uma compreensão mais clara. A partir deste modelo podemos pensar em delineamentos envolvendo neutrófilos de pacientes com LES, bem como estudar potenciais drogas moduladoras das respostas envolvendo o CR3.

Palavras-chave: neutrófilos; CR3; mieloperoxidase; endotélio.

## ABSTRACT

CANICOBA, N. C. ***In vitro* activation of neutrophils via CR3: implications of the CD11b chain variant (rs1143679) for interactions with the endothelium.** 2016. 102f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neutrophil is the most abundant leukocyte in circulation. It is the first line of defense against infections, mainly due to their granules full of digestive enzymes. The main protein of its granules is myeloperoxidase (MPO), which contributes to the microbicidal activity of neutrophils by mediating the generation of reactive oxygen molecules. However, MPO may also harm the host itself: MPO is involved in inflammation and tissue damage. The release of MPO directly on the endothelium is dependent of neutrophil-endothelium interaction. This is mediated by the interaction of the integrin CD11b/CD18 (complement receptor type 3, CR3) expressed by neutrophils and the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in the endothelium. A polymorphism in the *ITGAM* gene (integrin alpha M), which codifies CD11b integrin ( $\alpha$ M) of CR3 impairs both the interaction with its ligands and cell adhesion. There are few functional studies assessing this variant, the majority in transfected cells. In this way, the aim of this study was to evaluate the implications of CD11b chain variant of CR3 for neutrophil-endothelium interactions. Allelic variants were determined by polymerase chain reaction; endothelial cells (EC) extracted from the umbilical vein were exposed to neutrophils expressing variants 77R or 77H, which were stimulated or not with Zimosan, immunocomplexes with F(ab')<sub>2</sub> - both opsonized with normal human serum (NHS) or treated with inactivated human serum (SHI) - and formil-methyl-leucyl-phenylalanine (fMLP); aggression to the EC was evaluated by measuring lipid peroxidation by reactive substances to thiobarbituric acid method; Transfer of MPO from neutrophils to EC was analyzed by flow cytometry with specific monoclonal antibody; assessment of endothelial activation was evaluated by of ICAM-1 release by immunoenzymatic method. The results show that i) neutrophils bearing 77H variant without stimuli caused increased lipid peroxidation compared to neutrophils bearing R77 variant in homozygosis; ii) lipid peroxidation was increased when neutrophils were stimulated with stimuli opsonized by SHN; iii) neutrophils stimulated with F(ab')<sub>2</sub> / SHN bearing 77R variant had increased lipid peroxidation compared to neutrophils bearing 77H; iv) the MPO transfer to endothelial cells is dependent on the availability of CR3 and contact with neutrophils; v) CR3-dependent stimuli promoted an increase in endothelial activation measured by soluble ICAM-1; complement removal (HIS) minimizes this activation; vi) the model allowed us to observe the dependence of CR3 for all the studied functions. The results reflect the diversity of mechanisms involved in the studied interactions and point to the need for refinement of experimental models for a more clarifying understanding from this model we can think of designs involving patients with SLE neutrophils, as well as studying potential modulatory drug responses involving CR3.

Keywords: neutrophil; CR3; myeloperoxidase; endothelium

## RESUMEN

CANICOBA, N. C. **La activación in vitro de los neutrófilos a través de CR3: implicaciones de la variante de la cadena de CD11b (rs1143679) para la interacción con el endotelio.** 2016. 102F. Disertación (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

El neutrófilo es el leucocito predominante en el corriente sanguíneo. Siendo un fagocito profesional, contiene gránulos ricos en enzimas digestivas, que es su primera línea de defensa contra las infecciones. La proteína principal de sus gránulos es la mieloperoxidasa (MPO), que contribuye para la actividad microbicida de los neutrófilos en mediar la generación de especies reactivas de oxígeno, responsables por degradar muchas estructuras biológicas de los patógenos, pero también puede dañar propia estructura. Los efectos nocivos de la MPO se asocian con procesos inflamatorios que dañan el endotelio y sostienen la inflamación. La liberación de MPO por neutrófilos directamente sobre el endotelio depende de la interacción célula-célula mediada por la integrina CD11b/CD18 (receptor de tipo 3 para el complemento, CR3) expresado en neutrófilos y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) en el endotelio, lo que sugiere la participación de CR3 en el daño a los tejidos y en la inflamación crónica. Un polimorfismo en el gen *ITGAM* (integrina, alfa M) que codifica la integrina CD11b ( $\alpha$ M) de CR3 influye en la interacción con sus ligantes y afecta la adhesión celular. Existen pocos estudios funcionales de esta variante, la mayoría en células transfectadas. El objetivo de este estudio fue evaluar las implicaciones de la variante de la cadena de CD11b do CR3 para las interacciones de neutrófilos al endotelio. Los genotipos para la identificación de variantes alélicas se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa; células endoteliales (CE) extraídas de la vena umbilical fueron expuestas a neutrófilos que expresan variantes 77R y 77H, que fueron estimulados o no con Zymosan, inmunocomplejos con F(ab')<sub>2</sub> - tanto opsonizado con suero humano normal (SHN) o se trató con suero inactivado humano (SIH) - o formil-metil-leucil-fenilalanina (fMLP); agresión a la CE se evaluó mediante la medición de la peroxidación de lípidos por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; transferencia de MPO de neutrófilos a la CE se analizó mediante citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal específico; la activación endotelial se evaluó mediante la liberación de ICAM-1 por inmunoensayo enzimático. Los resultados mostraron que i) neutrófilos no estimulados expresando 77H causaron un mayor daño al endotelio, con una mayor peroxidación de lípidos; ii) La peroxidación lipídica aumento cuando los neutrófilos respondieron a estímulos opsonizados con SHN; iii) los neutrófilos expresando 77R estimulados con F(ab')<sub>2</sub>/SHN produjeron más peroxidación lipídica; iv) la transferencia de MPO a las células endoteliales es dependiente de la disponibilidad de CR3 y del contacto con los neutrófilos; v) El aumento de la concentración de ICAM-1 soluble es dependiente de estímulos opsonizados con SHN; la eliminación del complemento (SHI) minimiza esta activación; vi) el modelo nos permitió observar la dependencia de CR3 para todas las funciones estudiadas. Los resultados reflejan la diversidad de los mecanismos implicados en las interacciones estudiadas y señalan la necesidad de perfeccionar los modelos experimentales para una comprensión más clara. A partir de este modelo podemos pensar en diseños que implican los pacientes con LES con los neutrófilos, así como el estudio de posibles fármacos que modulan las respuestas que implican el CR3.

Palabras clave: neutrófilos; CR3; mieloperoxidasa; endotelio.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do receptor para complemento tipo 3 (CR3) .....	26
<b>Figura 2.</b> Os grânulos dos neutrófilos: tipos, componentes, ordem de produção durante a origem e desenvolvimento do neutrófilo, comparação de tamanho e ordem de desgranulação.....	29
<b>Figura 3.</b> Ciclos de peroxidação e halogenação da mieloperoxidase.....	31
<b>Figura 4.</b> Etapas do mecanismo de migração dos neutrófilos pelo endotélio mediadas por interações entre moléculas no neutrófilo e respectivos ligantes nas células endoteliais. ....	34
<b>Figura 5.</b> Produtos de PCR para o polimorfismo rs1143679 do gene <i>ITGAM</i> representados pelos genótipos de seis indivíduos.....	56
<b>Figura 6.</b> Neutrófilos purificados pelo método da gelatina, submetidos à citocentrifugação e corados por corante panótico. ....	57
<b>Figura 7.</b> Representação dos histogramas de fluorescência para a identificação do CD31 nas células endoteliais .....	58
<b>Figura 8.</b> Medida da lesão endotelial.....	59
<b>Figura 9.</b> Citogramas bidirecionais demonstrando a população de células analisadas. ....	61
<b>Figura 10.</b> Representação dos histogramas de fluorescência para a quantificação de mieloperoxidase transferida pelos neutrófilos para as células endoteliais e do painel de dados registrados.....	62
<b>Figura 11.</b> Transferência de mieloperoxidase pelos neutrófilos para as células endoteliais avaliada por citometria de fluxo.....	64
<b>Figura 12.</b> ICAM-1 solúvel como marcador de ativação endotelial.....	65
<b>Figura Suplementar 1.</b> Quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células endoteliais.....	82
<b>Figura Suplementar 2.</b> Quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células endoteliais.....	83
<b>Figura Suplementar 3.</b> Quantificação da porcentagem de células fluorescentes marcadas com anti-MPO em placas <i>transwell</i> . ....	84
<b>Figura Suplementar 4.</b> Curva da concentração de malonaldeído para cálculo da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para células endoteliais .....	85
<b>Figura Suplementar 5.</b> Curva da concentração de ICAM-1 para cálculo da concentração de ICAM-1 liberado pelas células endoteliais. ....	85
<b>Fluxograma 1.</b> Delineamento experimental.....	42



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos oligobucleotídeos.....	53
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A	Adenina (nucleotídeo)
BPI	Proteína bactericida indutora de permeabilidade (do inglês, <i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i> )
BSA	Albumina de soro bovino
C3bi	Fragmento inativado do componente C3 do complemento
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFD	Diluyente para fixação do complemento
C	Citosina (nucleotídeo)
CE	Célula endotelial
CR	Receptor para complemento
CR1	Receptor para complemento tipo 1
CR3	Receptor para complemento tipo 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio

F(ab') <sub>2</sub>	Fragmento bivalente de ligação ao antígeno (do inglês, <i>Fragment Antigen Binding</i> ) desprovido do fragmento Fc
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina
Fc $\gamma$ R	Receptor para o Fc da imunoglobulina G (IgG)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	Formil-Metil-Leucil-Fenilalanina
G	Guanina (nucleotídeo)
Gp	Glicoproteína
H	Histidina (aminoácido)
HGH	Hormônio do crescimento humano (do inglês, <i>Human Growth Hormone</i> )
HUVEC	Célula endotelial de veia de cordão umbilical (do inglês, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> )
IC	Imunocomplexo(s)
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular (do inglês, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> )
IL	Interleucina
ITGAM	Integrina alfa M (do inglês, <i>integrin alpha M</i> )
ITGB2	Integrina beta 2 (do inglês, <i>integrin subunit beta 2</i> )

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LFA-1	Antígeno 1 associado à função de leucócito (do inglês, <i>leukocyte function-associated antigen-1</i> )
LTB4	Leucotrieno B4 (do inglês, <i>leukotriene b4</i> )
MATER	Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto
MMP	Metaloproteinase(s) de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
Ne	Neutrófilo
NGAL	Lipocalina do neutrófilo associada à gelatinase (do inglês, <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> )
NRAMP1	Proteína 1 do macrófago associada à resistência natural (do inglês, <i>natural resistance associated macrophage protein-1</i> )
Pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula 1 de adesão da célula endotelial à plaqueta (do inglês, <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i> )

Phox	Oxidase do fagócito (do inglês, <i>phagocyte oxidase</i> )
PMN	Polimorfonuclear
PSGL-1	Glicoproteína 1 ligante de P-selectina (do inglês, <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> )
R	Arginina (aminoácido)
rs	Referência do SNP (do inglês, <i>reference snp</i> )
SBF	Soro bovino fetal
SC	Sistema Complemento
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SHI	Soro humano inativado
SHN	Soro humano normal
SNP	Polimorfismo de um nucleotídeo (do inglês, <i>single polymorphism nucleotide</i> )
TBE	Tris-borato-EDTA
T	Timina (nucleotídeo)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis fator</i> )
VCAM-1	Molécula 1 de adesão à célula vascular (do inglês, <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
VLA-4	Integrina de antígeno tardio 4 (do inglês, <i>integrin very late antigen-4</i> )
Zi	Zimosan

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Resumen.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Introdução .....	24
1.1 Receptor para complemento tipo 3 (CR3) .....	25
1.2 Neutrófilo .....	27
1.3 Mieloperoxidase (MPO) .....	30
1.4 Neutrófilos, endotélio e inflamação .....	32
Justificativa .....	36
Objetivos .....	38
3.1. Objetivo Geral .....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
Casuística e Metodologia .....	40
4.1. Casuística .....	41
4.2. Amostras de sangue .....	42
4.2.1 Fonte de neutrófilos, DNA e soro .....	42
4.2.2 Obtenção de soro com fonte de complemento.....	44
4.3 Estímulos para os neutrófilos.....	45
4.3.1 Estímulos via CR3.....	45
4.3.2 Estímulo independente de CR3 .....	47
4.4 Cultura de células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC).....	47
4.4.1 Plaqueamento das células endoteliais .....	47
4.4.2 Quantificação do CD31 .....	48
4.5 Células endoteliais expostas aos neutrófilos .....	49
4.6 Avaliação da MPO no sobrenadante das culturas de células endoteliais expostas aos neutrófilos .....	50
4.7 Ensaio de avaliação de peroxidação lipídica .....	50
4.8 Quantificação de MPO transferida às células endoteliais expostas aos neutrófilos .....	50

4.9	Quantificação de ICAM-1 liberada das células endoteliais expostas aos neutrófilos .....	51
4.10	Análise dos genótipos para R77H .....	52
4.11	Análises estatísticas .....	54
	Resultados .....	55
5.1.	Genotipagem do HNA-4a (CR3) .....	56
5.2	Avaliação da purificação dos neutrófilos .....	56
5.3	Quantificação do CD31 .....	57
5.4	Ensaio da avaliação de peroxidação lipídica – Marcador de lesão endotelial ..	58
5.5	Ensaio da MPO no sobrenadante das culturas de células endoteliais .....	60
5.6	Transferência de MPO para as células endoteliais expostas aos neutrófilos ..	60
5.7	Expressão de ICAM-1 .....	64
	Discussão .....	66
	Conclusão .....	74
	Referências Bibliográficas .....	76
	Material Suplementar .....	84
9.1.	Desenho do <i>primer</i> .....	85
9.2	Figuras suplementares .....	86
9.3	Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas.....	90
	Anexos .....	93

# *Introdução*



## 1.1 Receptor para complemento tipo 3 (CR3)

O receptor para complemento tipo 3 (CR3) é um heterodímero da família das  $\beta$  integrinas, também conhecido como CD11b/CD18, Mac-1 ou  $\alpha$ M $\beta$ 2-integrina, que tem um importante papel nos processos de adesão celular e fagocitose (Rosetti, Mayadas, 2016).

O CR3 é predominantemente expresso em células mieloides como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A interação do CR3 com seus ligantes está envolvida em importantes funções efetoras do sistema imune, como o sinergismo do CR3 com os receptores para imunoglobulinas G (Fc $\gamma$ R) nos neutrófilos para mediar a fagocitose de imunocomplexos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a desgranulação por estas células. Destaca-se também, a ligação do CR3 do neutrófilo com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) nas células endoteliais para mediar as interações neutrófilos-endotélio responsáveis pela migração celular (Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007).

Este receptor é composto por uma cadeia  $\alpha$  (CD11b) associada a uma cadeia  $\beta$  (CD18) por ligações não covalentes. A primeira é codificada pelo gene *ITGAM* (*integrin, alpha M*; cromossomo 16p11.2) e é a responsável por conferir a ligação do CR3 a inúmeras moléculas - proteínas da matriz extracelular, fibrinogênio, ICAM-1 e o fragmento inativado do componente C3 do complemento (C3bi) (Rosetti, Mayadas, 2016). Enquanto que a subunidade CD18 é codificada pelo gene *ITGB2* (*integrin subunit beta 2*; cromossomo 21q22.3). Cada uma das subunidades apresenta três tipos de domínio: um extracelular, um transmembrana e um intracelular (Faridi *et al.*, 2010).

No domínio extracelular da subunidade  $\alpha$ , há uma região denominada de domínio I, que é responsável por mediar a ligação do CR3 com seus ligantes. Normalmente, o domínio extracelular está compactado e fechado, impedindo a interação do CR3 com seus ligantes, inferindo uma baixa afinidade ao CR3. Porém, quando há ativação celular, o domínio extracelular muda sua conformação permitindo a exposição do sítio de ligação do CR3 e inferindo uma maior afinidade dessa molécula com seus ligantes (Evans *et al.*, 2009; Gahmberg *et al.*, 2009).

A subunidade  $\alpha$ , cadeia CD11b, apresenta um polimorfismo determinado por uma mutação no gene *ITGAM*, com a troca de um único nucleotídeo (*snp, single*

*nucleotide polymorphism*), guanina por adenina (G230A; *reference snp - rs1143679*). Esta mutação pontual substitui uma arginina (R) por histidina (H) na posição 77 no domínio extracelular da molécula CD11b (R77H) (Figura 1), o que leva à alteração das estruturas terciárias e quaternárias do domínio de ligação, resultando na existência de duas variantes polimórficas – 77R e 77H. Esta substituição influencia a habilidade do CR3 em mediar a adesão celular aos ligantes ICAM-1 e -2 e também a ligação ao C3bi (Nath *et al.*, 2008; Macpherson *et al.*, 2011).

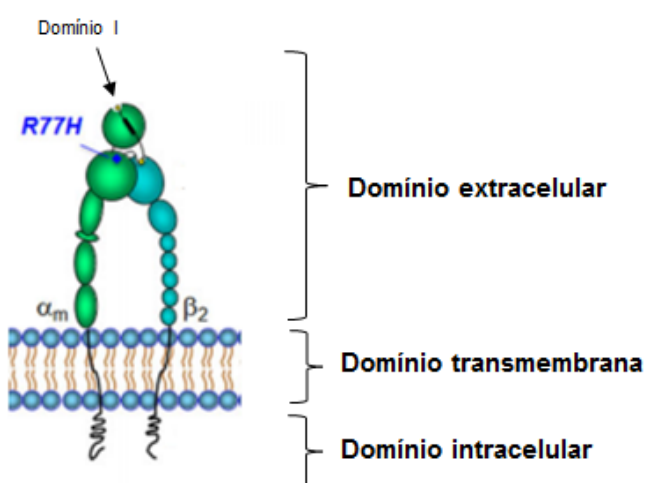


Figura 1. Representação do receptor para complemento tipo 3 (CR3). A Figura mostra as subunidades, cadeias  $\alpha$  (CD11b) e  $\beta_2$  (CD18), e os domínios do heterodímero. A localização da arginina (R) / histidina (H) está indicada como polimorfismo R77H. O sítio de ligação para os ligantes está indicado no Domínio I. Adaptado de Rosetti & Mayadas, 2016.

O polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* tem sido associado com o lúpus eritematoso sistêmico (LES), sendo a presença do alelo 77H para a cadeia CD11b associado ao risco relativo com a doença (Nath *et al.*, 2008; Anaya *et al.*, 2012; Toller-Kawahisa *et al.*, 2014). O LES é o protótipo de doenças por imunocomplexo (IC). É uma doença inflamatória crônica sistêmica, de caráter autoimune, que associa múltiplos fatores genéticos, hormonais e ambientais na sua etiologia complexa. Há deposição de IC em tecidos ou órgãos, levando a um processo inflamatório crônico e lesão tecidual, muito frequentemente manifestando vasculite e nefrite. A fisiopatologia

do LES envolve o sistema complemento (SC) e seus receptores (CR), neutrófilos, Fc $\gamma$ R e moléculas de adesão. Os produtos da ativação do SC atraem os neutrófilos para o foco inflamatório e sua interação com os IC depositados resulta na liberação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e das enzimas dos grânulos dos neutrófilos sobre os tecidos, as quais causam danos às estruturas celulares, por estresse oxidativo, levando à exposição de autoantígenos e sustentando a autoimunidade (Alarcón-Segovia *et al.*, 1999; Guillevin, Dörner, 2007; Valko *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Rosetti, Mayadas, 2016).

Devido a associação do polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* com a suscetibilidade ao LES, muitos estudos têm sido direcionados ao entendimento da influência da variante polimórfica 77H nas funções imunes mediadas por CR3. Contudo, diante da complexidade de fatores envolvidos no LES, ainda não há uma compreensão precisa que pudesse esclarecer a associação da variante 77H com o LES. Considerando-se a importância das interações neutrófilo-SC-endotélio no processo inflamatório e lesão tecidual por IC no LES, há de se considerar modelos para estudar essa relação frente à presença da variante 77H.

## 1.2 Neutrófilo

As primeiras observações sobre as características morfológicas e tintoriais do neutrófilo, descrevendo seu núcleo segmentado e grânulos no citoplasma, foram feitas por Paul Ehrlich no final do século XIX. Logo em seguida, Elie Metchnikoff descreveu a capacidade do neutrófilo de fagocitar “objetos estranhos”, a fim de defender o organismo contra patógenos (Cavaillon, 2011; Amulic *et al.*, 2012).

A partir destas descobertas o conhecimento sobre a fisiologia dos neutrófilos tem evoluído progressiva e continuamente até os dias de hoje. O interesse na biologia do neutrófilo se deve à importância desta célula para a resposta imune. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio de inflamação ou infecção para contenção de partículas estranhas, graças à sua capacidade de realizar fagocitose e de destruição das mesmas. Além disso, os neutrófilos participam de uma rede de interações, através de mediadores solúveis e moléculas de membrana, que permite a comunicação com outros tipos celulares para e o estabelecimento da resposta imune adequada para a homeostase (Kumar e Sharma, 2010).

Quanto à origem, os neutrófilos são produzidos na medula óssea a partir de precursores mieloides que se diferenciam de mieloblasto até o neutrófilo maduro (neutrófilo segmentado). O processo de produção e maturação dos neutrófilos é chamado de granulopoiese e representa dois terços da produção de células sanguíneas (hematopoiese) pela medula óssea (Borregaard, 2011). Os neutrófilos maduros migram da medula óssea para a corrente sanguínea e em humanos eles constituem cerca de 50 – 70% dos leucócitos circulantes (Kolaczkowska e Kube, 2013; Krueger *et al.*, 2015).

Quanto à morfologia, os neutrófilos maduros apresentam um diâmetro médio de 7 a 10 $\mu$ m. O núcleo é segmentado com 3 a 5 lóbulos, característica esta que lhe confere a classificação como leucócitos polimorfonuclear (PMN). E devido o conteúdo expressivo de grânulos no seu citoplasma, os neutrófilos são também classificados como granulócitos. Quatro tipos de grânulos são encontrados no citoplasma dos neutrófilos. Três deles são formados durante a maturação da célula e contêm em seu interior proteínas pró-inflamatórias. Esses grânulos são os azurófilos ou primários, os específicos ou secundários e os de gelatinase ou terciários. O quarto tipo de grânulo são as vesículas secretoras, as quais podem transportar rapidamente seu conteúdo para a superfície celular, onde suas proteínas vesiculares se incorporaram à superfície da membrana (Kolaczkowska e Kube, 2013). As vesículas secretoras são os últimos grânulos a serem formados, porém os primeiros a serem liberados, visto que a ordem de constituição e de desgranulação dos grânulos é oposta, como pode ser visto na Figura 2 (Ma *et al.*, 2013).

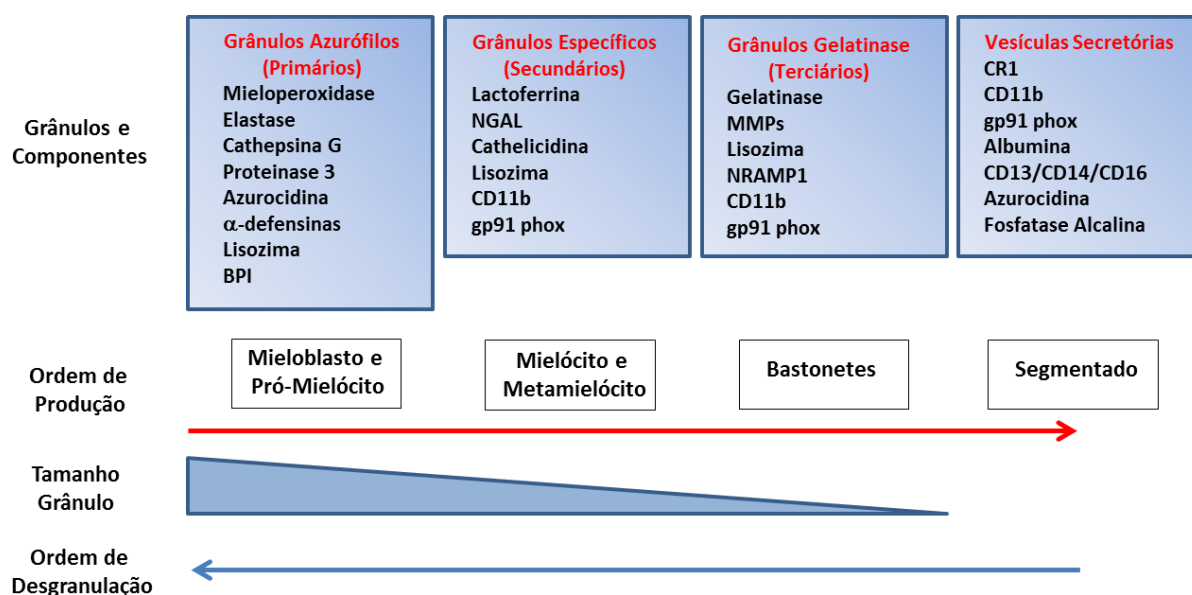


Figura 2. Os grânulos dos neutrófilos: tipos, componentes, ordem de produção durante a origem e desenvolvimento do neutrófilo, comparação de tamanho e ordem de desgranulação. BPI, proteína bactericida indutora de permeabilidade; NGAL, lipocalina do neutrófilo associada à gelatinase; gp, glicoproteína; phox, oxidase do fagócito; MMP, metaloproteínas da matriz; NRAMP1: proteína 1 do macrófago associada à resistência natural; CR1: receptor para complemento tipo 1. Adaptado a partir de Borregaard e Cowland (1997) e Ma *et al.* (2013).

A função primária dos neutrófilos é o reconhecimento para destruição e erradicação de partículas estranhas (Nauseef, 2007). Para tanto, o neutrófilo é provido de sistemas oxidantes, que inclui o complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, bem como de um arsenal de enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, presente nos seus grânulos citoplasmáticos. O complexo NADPH oxidase é composto por ao menos sete proteínas que residem no citosol e em compartimentos de membrana nos neutrófilos em repouso. Uma vez ativado, os componentes presentes no citosol se translocam para a membrana do fagossomo e se associam com o flavocitocromo  $b_{558}$ , formando a NADPH oxidase (Klebanoff, 2005).

A NADPH oxidase é responsável pelo mecanismo conhecido como *burst* oxidativo, que converte o oxigênio em ânion superóxido dando início à geração das espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, somadas às enzimas dos grânulos, medeiam a destruição das partículas fagocitadas (Graham, 2007; Nathan, 2006; Hager *et al.*, 2010).

O ânion superóxido formado pela ação da NADPH oxidase é instável e por isso pode sofrer dismutação espontânea, formando o peróxido de hidrogênio, o qual servirá de substrato para a mieloperoxidase (MPO) dos grânulos dos neutrófilos. A MPO, por sua vez, contribuirá com uma sequência de reações, cujos produtos somados aos conteúdos dos grânulos, formam o arsenal tóxico do neutrófilo para a destruição das partículas fagocitadas. Este arsenal é limitado ao interior do neutrófilo. Fisiologicamente, a quantidade de compostos tóxicos que extravasam para o meio extracelular é rapidamente neutralizado por anti-proteinases existentes no fluido intersticial. No entanto, existem circunstâncias nas quais este conteúdo dos neutrófilos extravasa em quantidades excessivas, principalmente nos processos inflamatórios crônicos, resultando em lesão tecidual e perda da função dos órgãos afetados (Moraes *et al.*, 2006; Borregaard *et al.*, 1997; 2007; Häger *et al.*, 2010; Nathan, 2010; Amulic *et al.*, 2012). Assim, os mecanismos efetores dos neutrófilos – tão importantes para as defesas do hospedeiro - também estão envolvidos na fisiopatologia de processos inflamatórios crônicos.

### 1.3 Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma proteína da família das hemeperoxidases, codificada pelo gene homônimo no cromossomo 17 em humanos, e é a enzima mais abundante dos neutrófilos. Ela se localiza nos grânulos azurófilos, sendo liberada durante a desgranulação como um importante sistema oxidante microbicida (Ma *et al.*, 2013; Klebanoff *et al.*, 2013).

Contudo, a MPO dos neutrófilos tem sido associada com a agressão ao endotélio nos processos inflamatórios (Villanueva *et al.*, 2011). A deposição da MPO no endotélio pode levar à geração de oxidantes no local, atrair e ativar mais neutrófilos, acelerando e amplificando o processo inflamatório (Klinke *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2005). A deposição da MPO no endotélio requer o contato íntimo neutrófilo-endotélio e é dependente da integrina CR3, sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual em condições inflamatórias crônicas como a vasculite lúpica (do LES) e a aterosclerose (Jerke *et al.*, 2013).

Assim como todos os medidores existentes nos grânulos, a MPO só é liberada quando receptores na membrana do neutrófilo ou na membrana do fagossomo

sinalizam para o citoplasma, ativando a translocação do grânulo azurófilo para a membrana celular. A fusão da membrana do grânulo com a membrana do fagossomo formam o fagolisossomo, e, em seguida, a liberação do conteúdo dos grânulos ocorre, em geral, no fagolisossomo, podendo em algumas circunstâncias extravasar para o meio extracelular (Lau *et al.*, 2005).

A MPO atua de dois modos: convertendo o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, chamado de ciclo de peroxidação; ou convertendo íons haletos em ácidos hipohalosos, chamado ciclo de halogenação (Figura 3) (Panassenko *et al.*, 2012). O que determina qual ciclo essa enzima irá realizar é a competição entre os substratos de peroxidação e de haletos (Patterson *et al.*, 2014).

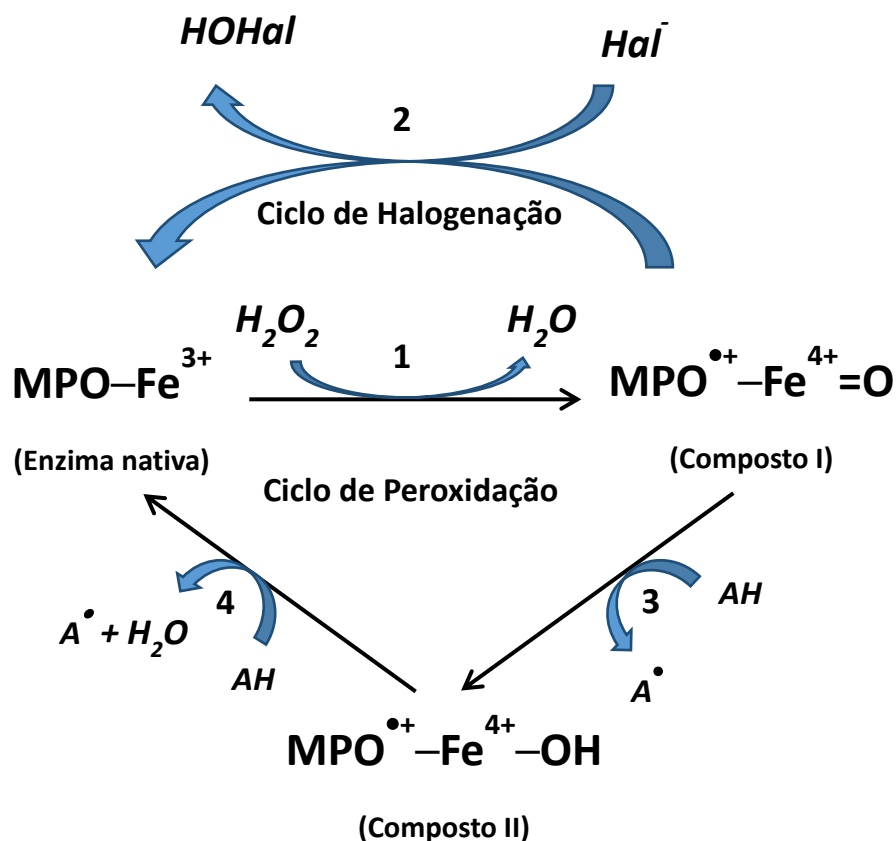


Figura 3. Ciclos de peroxidação e halogenação da mieloperoxidase. MPO, mieloperoxidase. Hal, halogênio;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio;  $H_2O$ , água;  $HOHa$ , ácido hipohaloso. Adaptado a partir de Panassenko *et al.* (2012).

O ciclo de halogenação se inicia quando a forma nativa da enzima ( $MPO-Fe^{3+}$ ) é rapidamente oxidada pelo  $H_2O_2$ , tornando-se  $MPO^{\bullet+}-Fe^{4+}=O$  (composto I) (Figura 3,

reação 1). Essa nova forma da MPO apresenta alta reatividade e catalisa a oxidação de íons haleto, formando ácidos hipohalosos (Figura 3, reação 2), como ácido hipocloroso (HOCl), e reduzindo o composto I para a forma nativa da MPO. Já o ciclo de peroxidação ocorre quando há presença de doadores de elétron, como nitrato, nesse caso, o composto I será transformado em MPO-Fe<sup>4+</sup>-OH (composto II) (Figura 3, reação 3), o qual sofrerá uma oxidação e voltará a sua forma nativa (Figura 3, reação 4) (Panassenko *et al.*, 2012).

A MPO liberada no sítio inflamatório também pode exercer um papel autócrino no neutrófilo ao se associar ao CR3. Essa associação altera vias de sinalizações intercelulares, levando ao aumento da produção de ERO e aumentando a expressão de CR3 na superfície do neutrófilo (Lau e Baldus, 2006).

#### 1.4 Neutrófilos, endotélio e inflamação

A inflamação é um processo fisiológico normal, de defesa, em resposta a uma agressão ao organismo. Esse processo envolve o recrutamento de leucócitos e mediadores para o tecido agredido seja por patógenos, lesão ou irritação (Ashley *et al.*, 2012).

O endotélio vizinho ao tecido inflamado libera citocinas, como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-17 (IL-17) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), causando dilatação vascular, aumento da permeabilidade dos capilares, diminuição do fluxo sanguíneo próximo ao sítio inflamatório e recrutamento de leucócitos (Freire e Van Dyke, 2013).

Além das citocinas liberadas pelo endotélio, os macrófagos residentes no local da inflamação fagocitam os patógenos e também liberam citocinas para recrutar outras células (Borregaard, 2010). Os neutrófilos são uma das primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório. Para exercerem suas funções efetoras, os neutrófilos deixam a circulação sanguínea, por diapedese por meio do endotélio vascular que está próximo do sítio inflamatório, pois nessa região a parede do vaso está fina e o diâmetro é suficientemente pequeno para que o neutrófilo possa fazer contato com a parede do vaso. Assim, eles migram em direção ao foco de infecção ou de lesão tecidual, por quimiotaxia (Rose *et al.*, 2007; Borregaard, 2010).

Este processo ocorre graças à capacidade dos neutrófilos de reconhecerem e serem ativados por quimiocinas, produtos bacterianos e peptídeos quimiotáticos



gerados pela ativação do sistema complemento, que são liberados na proximidade do foco inflamatório (Ley *et al.*, 2007; Trouw, Daha, 2011; Borregaard, 2010). Durante a migração, ambos neutrófilos e endotélio participam ativamente de uma série de eventos que guiam os neutrófilos para regiões do endotélio permissivas à migração (Zarbock e Ley, 2008).

A etapa inicial da adesão ao endotélio envolve a captura (*tethering*) dos neutrófilos mediada pelas interações com glicoproteínas expressas nos leucócitos (L-selectinas), no endotélio lesionado (E-selectinas e P-selectinas) e nas plaquetas (P-selectinas), capazes de interagir com ligantes glicosilados. Em seguida, os neutrófilos rolam (*rolling*) sobre o endotélio, numa etapa mediada também por L-selectinas e P-selectinas e seus ligantes glicosilados. Então, os neutrófilos são arrastados (*arrest*) sobre o endotélio, por interações com as  $\beta 1$  e  $\beta 2$  integrinas e seus respectivos ligantes, e há um aumento da adesão e espalhamento dos neutrófilos no endotélio (Rose *et al.*, 2007; Borregaard, 2010).

Quando as integrinas dos neutrófilos – VLA-4 (*very late antigen 4*;  $\alpha 4\beta 1$ ) e CR3 – interagem com seus respectivos ligantes no endotélio – a molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1) e o ICAM-1 – ativam as células endoteliais, facilitando a migração dos neutrófilos (Borregaard, 2010). Portanto, a modulação do VLA-4 e do CR3 afeta a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. A Figura 4 ilustra as etapas de migração dos neutrófilos.

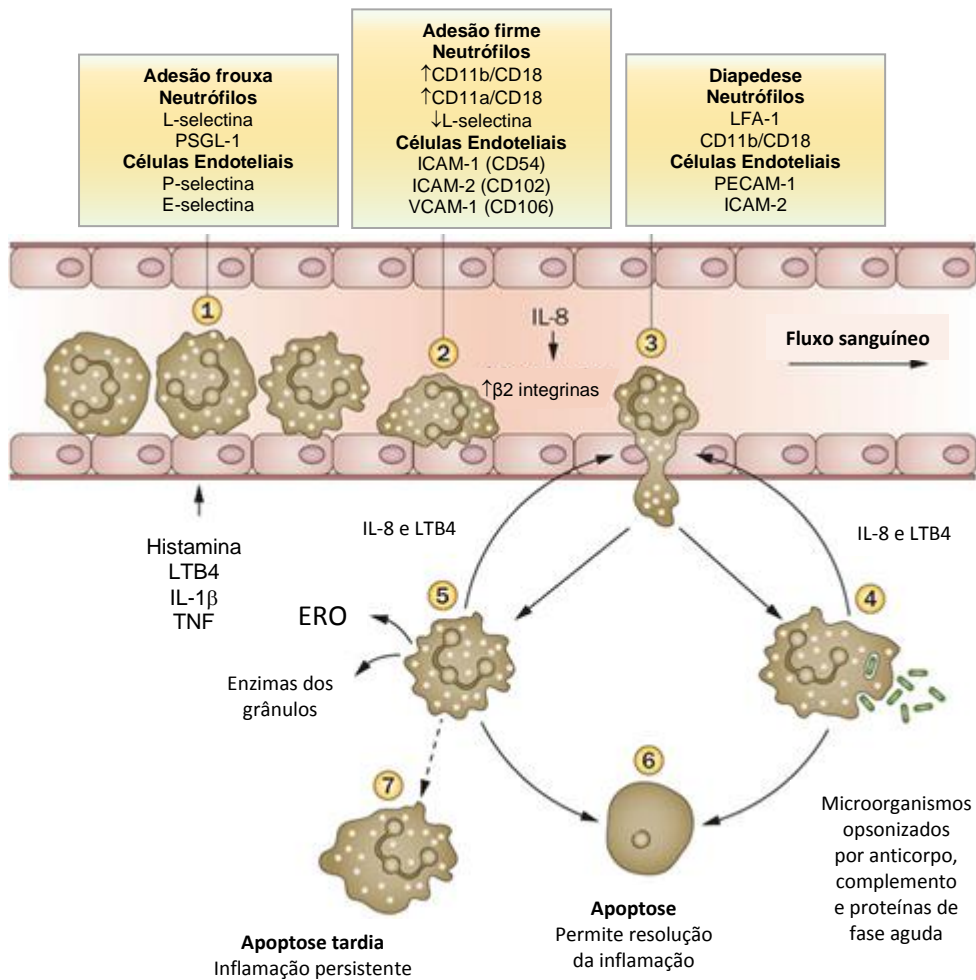


Figura 4. Etapas do mecanismo de migração dos neutrófilos pelo endotélio mediadas por interações entre moléculas no neutrófilo e respectivos ligantes nas células endoteliais. 1– captura (*tethering*) e o rolamento (*rolling*) dos neutrófilos sobre o endotélio vascular; 2– adesão firme do neutrófilo ao endotélio e arraste sobre o endotélio (*arrest*); 3- diapedese, migração paracelular e transcelular (não mostrada); 4– fagocitose e morte de microorganismos e/ou partículas; 5– neutrófilos ativados geram quimioatraentes, espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberam grânulos; 6- a resolução da inflamação é mediada pela apoptose eficiente dos neutrófilos residuais; 7– apoptose tardia resulta em inflamação persistente e dano tecidual mediado pelas ERO, enzimas dos grânulos e citocinas. PSGL, glicoproteína ligante de P-selectina; ICAM, molécula de adesão intercelular; VCAM, molécula de adesão à célula vascular; LFA, antígeno associado à função de leucócito; PECAM, Molécula de adesão da célula endotelial à plaqueta; IL, interleucina; LTB4, leucotrieno B4; TNF, fator de necrose tumoral. Adaptado de Wright *et al.* (2014).

Como descrito, a fisiologia da inflamação envolve as interações entre neutrófilos e endotélio com importante participação do CR3 (CD11b/CD18). As células endoteliais são continuamente expostas à ação dos produtos biologicamente ativos do complemento, os quais são rapidamente disponíveis na circulação quando ativados pelas partículas estranhas e IC no sítio inflamatório. Os principais efeitos destes produtos são favorecer sua interação com leucócitos circulantes e promover a migração destas células para o foco inflamatório. Vários produtos da ativação do complemento interagem com as células endoteliais e estimulam a expressão de moléculas de adesão, bem como promovem a secreção de fatores pró-inflamatórios. Em particular, quando há deposição de IC no endotélio, como na vasculite lúpica, as moléculas de C3bi, depositadas nos IC, e de ICAM-1, nas membranas das células endoteliais, ligam-se ao CR3 nos neutrófilos, promovendo a interação rápida entre neutrófilos e endotélio (Marks *et al.*, 1989; Lozada *et al.*, 1995; Mayadas, 2009). A fagocitose “frustrada” destes IC depositados leva à produção excessiva de ERO e desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, responsáveis pelo balanço *redox* do organismo, gerando o estresse oxidativo. Este, por sua vez, é um mediador de dano às estruturas celulares, incluindo lipídeos e proteínas na membrana e DNA. Além do dano ao endotélio, as ERO podem levar também ao aparecimento de novos epítopos em autoantígenos modificados pela oxidação, capazes de romper a tolerância ao próprio e contribuir para a autoimunidade (Kurien *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007). Ainda no LES, um aumento da expressão de ICAM-1 foi associado à ativação do endotélio concomitante ao aumento da expressão de seu receptor (CR3) nos leucócitos e exacerbação da doença (Spronk *et al.*, 1994).

Alguns estudos mostraram que neutrófilos com deficiência de CR3 são incapazes de migrarem através do endotélio, enquanto que o aumento da expressão de ICAM-1 favorece a adesão e migração dos neutrófilos pelas junções intercelulares no endotélio (Phillipson *et al.*, 2006). Esses neutrófilos desgranulam, a concentração de MPO liberada é alta para essas junções, fazendo com que o endotélio internalize essa enzima, levando à disfunção endotelial (Astern *et al.*, 2007). Assim, o estudo das interações entre neutrófilos, endotélio e CR3 é importante para o entendimento da fisiopatologia dos processos inflamatórios crônicos.

*Justificativa*

O papel do polimorfismo rs1143679 do CD11b do CR3 na interação neutrófilo-endotélio, envolvendo MPO e estresse oxidativo, não tem sido investigado ainda. Contudo, o entendimento desta interação é importante para a compreensão dos mecanismos que envolvem as defesas do hospedeiro e a interação neutrófilo-endotélio na patogênese dos processos inflamatórios.

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia dos receptores para IgG e de complemento no LES, tendo descrito alterações de expressão e de funções mediadas por estes receptores (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; 2005; Alves *et al.*, 2003; 2008), bem como a influência dos polimorfismos genéticos destes receptores nas funções efetoras dos neutrófilos e na suscetibilidade ao LES (Toller-Kawahisa, 2012; Toller-Kawahisa *et al.*, 2014; Vigato-Ferreira, 2012; Vigato-Ferreira *et al.*, 2014). Os resultados do grupo mostraram uma associação da variante 77H com suscetibilidade ao LES e com ocorrência de nefrite em pacientes brasileiros (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014), corroborando com outros grupos (Yang *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2011; Anaya *et al.*, 2012), bem como uma associação da presença da variante 77H com o aumento da produção de ERO por neutrófilos de pacientes com LES (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014). As associações da variante 77H com o risco ao LES e à nefrite lúpica têm implicações para o dano tecidual nos processos inflamatórios por deposição de imunocomplexos em órgãos e endotélio.

Diante do exposto, é importante estudar o polimorfismo do rs1143679 do CD11b do CR3 em um modelo fisiológico - utilizando-se neutrófilos de sujeitos saudáveis - para o entendimento da influência da variante 77H na biologia das funções mediadas pelo CR3. E, posteriormente, somar e aplicar o conhecimento para a compreensão da associação deste polimorfismo com a fisiopatologia e suscetibilidade ao LES.

*Objetivos*

### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar as implicações da variante da cadeia CD11b do CR3 para as interações neutrófilo-endotélio.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- a)** Avaliar a liberação de MPO por neutrófilos de indivíduos saudáveis, via CR3, e a aquisição de MPO por células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) em cultura, as quais serão expostas aos neutrófilos;
- b)** Determinar os genótipos para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3;
- c)** Analisar marcadores de lesão/ativação endotelial.

*Casuística e Metodologia*



#### 4.1. Casística

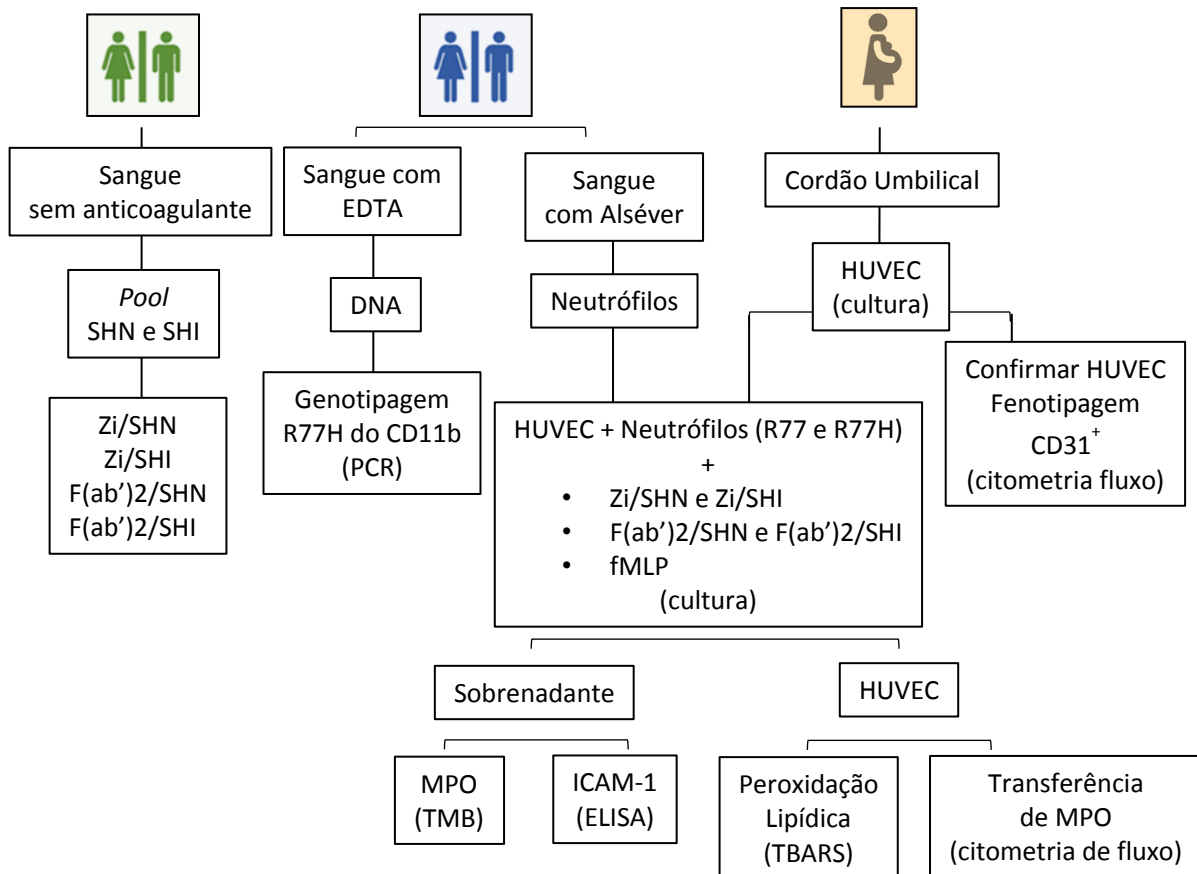
Este protocolo de pesquisa foi delineado de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, Brasil) e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP e Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto – MATER (este último devido ao recrutamento de gestantes para a obtenção do cordão umbilical) (Anexo A). Os voluntários foram esclarecidos sobre a pesquisa desenvolvida e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Neste estudo foram incluídos homens e mulheres aparentemente saudáveis, com idade entre 18 e 50 anos, pertencentes à comunidade do Campus da USP de Ribeirão Preto. O critério de exclusão geral foi tabagismo, uso de medicamento controlado, antibiótico, imunossupressor, gravidez e uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias.

Os participantes foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo A: doadores de sangue periférico para o estudo da função dos neutrófilos e para a genotipagem do polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 (n=30).
- Grupo B: doadores de sangue periférico para a obtenção de soro humano normal (SHN) (n=20). Este grupo foi composto por indivíduos com faixa etária entre 18 e 35 anos. Para mulheres o uso de contraceptivos hormonais (pílula, injetável, adesivo na pele e intra-uterino) foi acrescido como critério de exclusão.
- Grupo C: Pacientes da MATER doadoras de cordão umbilical utilizado para extração de células endoteliais. Esse grupo compreendeu gestantes aparentemente saudáveis, sendo o critério de exclusão o uso de medicamento controlado, antibiótico, imunossupressor e uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias (n=20).

O Fluxograma 1 apresenta o delineamento experimental.



Fluxograma 1. Delineamento experimental. 77H, histidina na posição 77; 77R, arginina na posição 77; DNA, ácido desoxirribonucleico; EDTA, ácido etileno diamino tetracético; ELISA, ensaio imunoenzimático; F(ab')<sub>2</sub>, fragmento de ligação ao antígeno bivalente desprovido do fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina; fMLP, Formil-Metil-Leucil-Fenilalanina; HUVEC, células endoteliais de cordão umbilical; ICAM-1, molécula 1 de adesão intercelular; MPO, mieloperoxidase; PCR, reação em cadeia da polimerase; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; TMB, tetrametilbenzidina; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; Zi, zimosan.

## 4.2. Amostras de sangue

### 4.2.1 Fonte de neutrófilos, DNA e soro

As amostras de sangue venoso periférico (30 mL) foram colhidas dos voluntários com sistema de coleta a vácuo e estéril. Para as amostras destinadas à genotipagem, o sangue foi colhido em tubos contendo anticoagulante, o sal tripotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K<sub>3</sub>). Para a obtenção de neutrófilos o sangue foi colhido em tubos estéreis sem anticoagulante e, em seguida,

misturado, volume a volume, com solução de Alséver pH 6,1 como anticoagulante. Para as amostras de soro, o sangue foi colhido em tubos sem anticoagulante e deixado em repouso para a retração do coágulo. As amostras de soro foram reunidas para formar um *pool* de soro humano normal (SHN), utilizado como fonte de proteínas do sistema complemento.

#### **4.2.1.1 Obtenção dos neutrófilos**

Os neutrófilos foram obtidos a partir da mistura de sangue total com uma solução de gelatina, segundo metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). Amostras de sangue total de cada doador, misturadas ao anticoagulante Alséver, foram submetidas à centrifugação à 664xg por 10 minutos em temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R). O plasma foi desprezado juntamente com a camada de células mononucleares. Os neutrófilos foram separados das outras células pela adição de solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15 M em quantidade equivalente a duas vezes o volume de células e as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Ao sobrenadante, o qual continha os neutrófilos, foi adicionado NaCl 0,15 M e as amostras foram centrifugadas à 526xg por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com NH<sub>4</sub>Cl 0,83% pH 7,2 para promover a lise dos eritrócitos remanescentes. A mistura foi mantida em banho-maria por 5 minutos a 37°C e, então, centrifugada à 562xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com NaCl 0,15 M e submetido à 562xg por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de solução de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1%.

Para calcular a concentração de neutrófilos obtidos na purificação, as células foram diluídas em líquido de Turk e os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer. Com essa metodologia o rendimento da purificação de neutrófilos é de 80-90%. A viabilidade celular foi analisada pela diluição de uma parte da suspensão de neutrófilos em solução de Azul de Tripán e os resultados foram sempre maiores que 95% de neutrófilos viáveis.

#### **4.2.1.2 Isolamento do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pela técnica

de *salting out* para a precipitação de macromoléculas, baseando-se no método descrito por Miller *et al.* (1988) e com algumas modificações.

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de 10 mL de sangue total colhido com anticoagulante EDTA-K<sub>3</sub>. As amostras foram transferidas para um tubo de 50 mL limpo e estéril, onde o volume foi completado até 45 mL com tampão de lise I para lise dos eritrócitos e a mistura foi cuidadosamente homogeneizada e submetida à centrifugação a 1157xg por 6 minutos à 20°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R). O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em uma mistura contendo 1,1 mL de perclorato, 125 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 4,5 mL de tampão de lise II para lise dos leucócitos. A mistura foi homogeneizada em vórtex e acrescida de 2 mL de NaCl saturado 6 M; novamente foi homogeneizada em vórtex e submetida a centrifugação a 1301xg por 8 minutos a 23°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e estéril e adicionou-se 5 mL de isopropanol. A solução foi lentamente homogeneizada até que o DNA fosse visível. O DNA foi retirado da solução e colocado em microtubo contendo 1 mL de etanol à 70% gelado. A mistura foi submetida à centrifugação a 2300xg por 5 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e o tubo foi mantido invertido sobre um papel de filtro absorvente durante 24 horas até a secagem completa.

O DNA presente no precipitado seco foi dissolvido em 200 µL de água destilada pura estéril, homogeneizado em vórtex por 30 segundos e armazenado à temperatura de -20°C, em microtubo fechado, até o momento do uso.

#### **4.2.2 Obtenção de soro com fonte de complemento**

Para a obtenção do soro as amostras de sangue venoso periférico (20 mL) foram colhidas dos voluntários com sistema de coleta a vácuo e estéril, sem anticoagulante. O sangue foi deixado em repouso à temperatura de 4°C durante 1 hora para retração do coágulo formado, sendo posteriormente centrifugado à 664xg por 10 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R). As amostras de soro foram reunidas para constituir um *pool* de soro humano normal (SHN), que foi utilizado como fonte de complemento. Parte deste *pool* foi submetida ao tratamento pelo calor a 56°C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento. Este soro inativado (SHI) foi usado como controle negativo da atividade do complemento.

Ambos os *pools*, SHN e SHI, foram aliquotados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 4.3 Estímulos para os neutrófilos

#### 4.3.1 Estímulos via CR3

##### 4.3.1.1 Zimosan

Zimosan opsonizado com o *pool* de SHN (Zi/SHN) e zimosan tratado com SHI (Zi/SHI) foram preparados como descrito anteriormente por Cheung *et al.* (1983). Para o preparo do zimosan, 15 mL de NaCl 0,15 M foi misturado a 20 mg do estímulo e deixado em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

Após o período de incubação, o zimosan foi centrifugado à  $562\times g$  por 10 minutos (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R); o sobrenadante foi desprezado, o zimosan foi ressuspenso em 15 mL de NaCl 0,15 M e a mistura foi estocada a  $4^{\circ}\text{C}$  por um dia. No dia seguinte a mistura foi centrifugada a  $562\times g$  por 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante desprezado e o precipitado foi ressuspenso como descrito a seguir: no primeiro tubo, o zimosan recebeu um volume do *pool* de SHN e o mesmo volume de tampão diluente para complemento (CFD) pH 7,2, contendo gelatina 0,1% (para cada 1000  $\mu\text{L}$  de o Zimosan adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do SHN + 500  $\mu\text{L}$  do CFD gelatina 0,1%); no segundo tubo, o zimosan recebeu o mesmo volume do tubo anterior de *pool* de SHI e o mesmo volume de CFD pH 7,2, contendo gelatina 0,1%. Os dois tubos foram mantidos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida eles foram submetidos a  $562\times g$  por 10 minutos e lavados uma vez nessas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso para 1 mg/mL em solução de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1% e mantido em gelo até o momento do uso.

##### 4.3.1.2 Imunocomplexos com $F(ab')_2$

Os fragmentos  $F(ab')_2$  foram obtidos a partir da digestão de IgG de coelho anti-albumina de soro bovino (BSA) digerida com pepsina previamente preparada e caracterizada no nosso laboratório. Os neutrófilos foram estimulados com o imunocomplexo (IC)  $F(ab')_2$ /BSA preparado em zona de equivalência, como descrito

previamente (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002). Para o preparo do IC com  $F(ab')_2$ , uma solução de BSA 1 mg/mL diluída 1:4 em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4 foi misturada volume a volume, com uma preparação de  $F(ab')_2$ , na proporção de equivalência e deixado em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após esse período, a mistura foi mantida a 4°C por duas noites e, então, centrifugada a 134000xg por 15 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5415R). O sobrenadante foi descartado e o IC com  $F(ab')_2$  foi lavado duas vezes com PBS e centrifugado a 134000xg por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de PBS.

A dosagem de proteína foi feita por espectrofotometria a partir de uma alíquota de 50  $\mu$ L do IC com  $F(ab')_2$  ressuspensão. A essa alíquota foi adicionado 200  $\mu$ L de PBS e a mistura foi centrifugada a 134000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em uma mistura de 50  $\mu$ L de NaOH 0,1 N e 950  $\mu$ L de PBS. A densidade óptica (DO) foi medida no comprimento de onda de 280 nm. A quantidade de proteína obtida foi estimada pelo seguinte cálculo:

$$\text{DO amostra (280 nm)} \times 0,715 = \text{quantidade de proteína (mg)}$$

Cada precipitado de IC com  $F(ab')_2$  foi ressuspensão como descrito a seguir: no primeiro tubo, o IC com  $F(ab')_2$  recebeu um volume do *pool* de SHN diluído 1:2 em CFD pH 7,2 contendo gelatina 0,1%, na proporção de 1  $\mu$ L dessa diluição para cada 1  $\mu$ g de IC com  $F(ab')_2$  [para cada 50  $\mu$ L de o  $F(ab')_2$  adicionou-se 50  $\mu$ L da diluição 1:2 do SHN (25  $\mu$ L do SHN + 25  $\mu$ L do CFD gelatina 0,1%)]; e no segundo tubo, o IC com  $F(ab')_2$  recebeu o mesmo volume do tubo anterior de um *pool* de SHI diluído nas mesmas condições. Os dois tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida eles foram submetidos a 134000xg por 5 minutos a 4°C e lavados duas vezes com PBS nessas mesmas condições de centrifugação. O precipitado foi ressuspensão para 1  $\mu$ g/ $\mu$ L em PBS pH 7,4 e mantido em gelo até o momento do uso.

### 4.3.2 Estímulo independente de CR3

O peptídeo Formil-Metil-Leucil-Fenilalanina (fMLP) sintético foi utilizado como estímulo independente de CR3, de acordo com metodologia previamente padronizada no nosso laboratório (Vigato-Ferreira, 2012). O fMLP foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração  $10^{-2}$ M e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No momento do uso, foi diluído em solução de Hanks pH 7,2 para a concentração final de  $10^{-6}$  M.

## 4.4 Cultura de células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC)

As células endoteliais foram extraídas da veia de cordão umbilical (HUVEC; do inglês, *human umbilical vein endothelial cells*). Os cordões foram cedidos por parturientes atendidas no Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto (MATER) e a obtenção das células endoteliais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Andrade *et al.* (2012).

Uma vez recebido o cordão, no laboratório este foi limpo com álcool 70% e suas extremidades foram cortadas com lâmina de bisturi para auxiliar na identificação da veia do cordão umbilical. Em seguida, o cordão foi lavado três vezes com PBS estéril com auxílio de uma seringa de 20 mL. Após a última lavagem foram inseridas torneiras de 3 vias na veia do cordão umbilical (uma em cada extremidade do cordão) e essas amarradas com fio cirúrgico de algodão para que as torneiras ficassem fixas. Adicionou-se 20 mL de colagenase do tipo II (Gibco®, EUA), o cordão foi colocado em um frasco limpo e estéril e incubado em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após o período de incubação o cordão foi massageado e seu conteúdo foi coletado em um tubo limpo e estéril. Adicionou-se 20 mL de PBS estéril à veia do cordão para coletar o que sobrou de colagenase dentro dela. O tubo foi centrifugado a  $562\times g$  por 5 minutos à temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R). Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi transferido para frascos de cultura de  $75\text{ cm}^2$ , contendo 10 mL de meio EGM2 (Lonza®, EUA) como descrito por Jerke *et al.* (2013).

### 4.4.1 Plaqueamentodas células endoteliais

Assim que as células atingiram 75% de confluência na superfície das garrafas de cultura, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas uma vez com PBS

estéril. Em seguida foi adicionada uma solução de tripsina (5 mL de tripsina 1X) e durante 5 minutos a garrafa contendo tripsina foi submetida a agitação manual suave para ajudar o desprendimento das células endoteliais. Em seguida, a mistura de células endoteliais e tripsina foi transferida para um tubo limpo e estéril contendo meio de cultura (o mesmo volume de tripsina utilizada na garrafa – 5 mL) e centrifugado a 562xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura.

A viabilidade celular foi determinada através da exclusão do corante azul de Tripán. A técnica consiste em misturar 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de células endoteliais na concentração de  $3\text{-}5 \times 10^6/\text{mL}$  com 190  $\mu\text{L}$  de azul de Tripán 0,4% em NaCl 0,15 M e contar as células endoteliais em câmara de Neubauer. As células não viáveis aparecem coradas em azul devido à permeabilidade da membrana ao corante. Após a contagem, as células foram plaqueadas em placas limpas e estéreis de 12 poços, sendo que em cada poço foi adicionado 1 mL de meio de cultura EGM2 (Lonza®, EUA) e as placas foram incubadas em estufa (marca Thermo Electron Corporation; modelo Forma Series II, Water Jacketed CO<sub>2</sub>) a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por dois dias.

#### **4.4.2 Quantificação do CD31**

O CD31 foi quantificado por citometria de fluxo (Guava – Mod. EasyCyte 8 HT – Merck Millipore®, Software: InCyte 2.7 – Merck Millipore®).

Para a confirmação de que as células plaqueadas eram endoteliais, uma alíquota de  $3 \times 10^6$  células foi retirada de cada garrafa cultivada após ser tripsinizada pela primeira vez (garrafa P0). Essa alíquota foi dividida em três tubos para citometria (cada um contendo  $1 \times 10^6$  células), os quais foram centrifugados a 562xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril, sendo centrifugado novamente a 562xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 300  $\mu\text{L}$  de PBS, seguido da marcação com o anticorpo como descrito a seguir: o primeiro tubo não foi marcado, de modo a servir como autofluorescência; o segundo tubo foi marcado com 5  $\mu\text{L}$  de isotipo IgG 1 $\kappa$  marcado com ficoeritrina (PE) (BD™ Pharmigen, EUA); e o terceiro tubo foi marcado com 5  $\mu\text{L}$



de anticorpo anti-CD31 marcado com PE (BD™ Pharmigen, EUA). Os tubos foram incubados por 40 minutos ao abrigo da luz e no gelo. Em seguida, eles foram submetidos à centrifugação a 562xg por 5 minutos a 4°C, o precipitado lavado com 1 mL PBS contendo 2% de soro bovino fetal (SBF), e novamente centrifugados a 562xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em 300 µL PBS contendo 1% de formaldeído e os tubos foram dispostos em triplicatas em uma placa limpa e estéril de 96 poços para leitura no citômetro de fluxo (gate em escala log).

Considerou-se a marcação efetiva quando pelo menos 75% das células endoteliais expressavam a molécula CD31.

#### **4.5 Células endoteliais expostas aos neutrófilos**

O ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita anteriormente por Hashimoto *et al.* (1992) e Jerke *et al.* (2013), com modificações. Após o período de incubação das placas, os poços (cada um contendo  $1 \times 10^6$  células) tiveram o meio de cultura retirado e foram lavados uma vez com 1 mL de PBS estéril para retirar resquícios de meio de cultura. Em seguida, os neutrófilos purificados (a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células) foram colocados em contato com as células e com os estímulos. A placa foi incubada por 30 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do período de incubação o sobrenadante de cada poço foi armazenado em microtubos limpos e estéreis e estocados a -80°C para a realização dos testes de quantificação de MPO e moléculas de adesão, enquanto que as células endoteliais foram lavadas duas vezes com PBS estéril. A cada poço da placa foi adicionado tripsina por 5 minutos e, nesse período, a placa recebeu agitação manual suave para facilitar o desprendimento das células. Após esse período, a mistura de células endoteliais e tripsina foram adicionadas em microtubos limpos e estéreis contendo meio de cultura (o mesmo volume de tripsina utilizado por poço). Esses tubos foram centrifugados a 562xg por 10 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5415R). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o precipitado foi utilizado para os testes de peroxidação lipídica e quantificação de MPO.

#### **4.6 Avaliação da MPO no sobrenadante das culturas de células endoteliais expostas aos neutrófilos**

A atividade da MPO foi analisada no sobrenadante do ensaio de exposição das células endoteliais aos neutrófilos estimulados via CR3. Este sobrenadante foi usado para a avaliação da atividade da MPO através da quantificação indireta de seu produto, ácido hipocloroso, descrita por Dypbukt *et al.* (2005). Após interação do ácido hipocloroso com a taurina em excesso presente no meio, ocorre a formação da taurina cloramina, que, por sua vez, é capaz de oxidar o tetrametilbenzidina (TMB), permitindo sua análise espectrofotométrica em 630 nm.

#### **4.7 Ensaio da avaliação de peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi analisada nas células endoteliais expostas aos neutrófilos estimulados via CR3. Estas células foram usadas para a determinação da concentração de malonaldeído (MDA), obtida pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Após a retirada cuidadosa do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de PBS estéril e cuidadosamente homogeneizado. A essas amostras foram adicionados 750 µL de solução do ácido tiobarbitúrico (TBA 67% NaOH 0,12N). As misturas foram homogeneizadas no vórtex por 5 segundos e incubadas em banho-maria a 100°C por 1 hora. Após a incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 534 nm.

#### **4.8 Quantificação de MPO transferida às células endoteliais expostas aos neutrófilos**

A MPO nas células endoteliais foi quantificada segundo Jerke *et al.* (2013). As análises foram feitas por citometria de fluxo (FACSCalibur™, software Cell Quest Pro™, Becton Dickinson).

Para a quantificação de MPO foram utilizadas as células do ensaio de exposição das células endoteliais aos neutrófilos estimulados via CR3. Estas células foram fixadas e permeabilizadas para a detecção do anticorpo anti-MPO. Assim, após a retirada cuidadosa do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de

solução de paraformaldeído 1% (para fixar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 562xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 1 mL de PBS a 562xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de solução de triton X-100 0,02% (para permeabilizar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas a 562xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 1 mL de PBS a 562xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de PBS e a essa mistura adicionou-se 5 µL do anticorpo anti-MPO (Invitrogen®, EUA – previamente titulado) ou isotipo (BD™ Pharmigen, EUA) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), a qual foi incubada por 1 hora a 4°C ao abrigo da luz. As amostras foram centrifugadas 562xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1 mL de PBS a 562xg por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de solução de PBS contendo 1% de formaldeído e a leitura foi realizada por citometria de fluxo (gate em escala linear).

#### **4.9 Quantificação de ICAM-1 liberada das células endoteliais expostas aos neutrófilos**

A determinação de ICAM-1 solúvel, liberada no sobrenadante, é uma medida indireta da expressão desta molécula nas células endoteliais expostas aos neutrófilos. A concentração de ICAM-1 foi determinada utilizando-se imunoenensaio enzimático com kits Quantikine (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EUA) de acordo com método previamente descrito (Stocco *et al.*, 2012). Foram utilizados os sobrenadantes das células endoteliais expostas aos neutrófilos estimulados via CR3. O ensaio foi desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 100 µL das amostras e padrões na placa, a qual foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente em um *shaker* de órbita de 10 mm (*enviromental shaker incubator biosan*, modelo ES20) a uma agitação descrita conforme o fabricante. A placa foi lavada quatro vezes com 220 µL do tampão de lavagem, sendo que após a última lavagem a placa foi vertida sobre um papel toalha limpo. Adicionou-se 200 µL

do anticorpo conjugado e a placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente em um shaker de órbita de 10mm a uma agitação descrita conforme o fabricante. A placa foi novamente lavada e 200  $\mu\text{L}$  da solução substrato foi adicionada. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Ao final dos 30 minutos, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N foi adicionado a cada poço para parar a reação e a leitura foi feita em um espectrofotômetro dentro de 30 minutos nos comprimentos de onda 450 e 540 nm.

#### 4.10 Análise dos genótipos para R77H

A genotipagem para o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 foi realizada pela técnica de amplificação do DNA genômico auxiliada pela polimerase (PCR, Reação em Cadeia da Polimerase).

Como controle positivo interno para o produto da PCR, foi adicionado, em todos os tubos, oligonucleotídeos controles para o gene do hormônio do crescimento humano (HGH). Todas as reações foram acompanhadas com um controle do *mix* de reação sem DNA e com amostras previamente genotipadas e sequenciadas em nosso laboratório. Foram utilizados oligonucleotídeos *sense* comum para as duas variantes e *anti-sense* específicos para cada alelo, segundo método descrito anteriormente (Clague *et al.*, 2003) e modificado por Toller-Kawahisa *et al.* (2014).

Dois tubos de *mix* foram preparados, correspondentes ao oligonucleotídeos para a amplificação dos alelos específicos 77R e 77H. A mistura de reação foi composta por 20  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos *sense* e 20  $\mu\text{M}$  de anti-sense alelo específico; 10  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos do HGH; 2 U da enzima Taq polimerase; 10 mM de dinucleotídeo trifosfato (dNTP); 5  $\mu\text{L}$  de tampão para PCR (10 vezes concentrado); 1,5 mM de cloreto de magnésio; e água deionizada estéril para completar o volume de reação para 50  $\mu\text{L}$ . A cada tubo, exceto no controle sem DNA, foi adicionada cerca de 400 ng de DNA genômico. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos

<b>Gene</b>	<b>Sequência dos oligonucleotídeos</b>
<b>HGH Sense</b>	5' GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA 3'
<b>HGH Anti-sense</b>	5' CTC ACG GAT TTC TGT GTT TC 3'
<b>Sense comum para 77R e para 77H</b>	5' CTC CCC ACA GGG TGG TG 3'
<b>77R Anti-sense</b>	5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG C 3'
<b>77H Anti-sense</b>	5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG T 3'

HGH, hormônio do crescimento humano; R, arginine; H, histidina; A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina.

As reações foram realizadas em um termociclador automático de temperatura (Mastercycle, Eppendorf) no seguinte protocolo: 15 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 58°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C de extensão final. O tamanho dos fragmentos obtidos para cada alelo R77H após a amplificação foi de 124 pares de base (pb) (Clague *et al.*, 2003).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3. Uma amostra de 25 µL do produto de cada PCR foi misturada a 5 µL de tampão de amostra contendo sacarose, azul de bromofenol e Gel Red (Uniscience, São Paulo, Brasil) e, então, aplicadas nos poços do gel com auxílio de pipeta. Amostras padrões de marcadores de número de pares de base (pb), DNA *ladder* 50 pb, foram acrescidas de GelRed e aplicadas nos géis (0,5 µg/poço).

Para o preparo dos géis foi feita uma mistura de 100 mL de Tris Borato EDTA (TBE) e 2 g de agarose (Uniscience), e colocada na cuba de eletroforese. As condições da corrida eletroforética foram 250 V, 40 mA, 100 W por 40 minutos. A corrida foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol, contido na mistura da amostra. Após a migração, o gel foi fotografado em fotodocumentador (Bio-Rad, Universal Hood II). As bandas aparecem fluorescentes devido à presença do Gel Red no tampão de amostra. Após a leitura, o gel foi descartado e as imagens digitalizadas foram arquivadas.

#### **4.11 Análises estatísticas**

Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism 5 (versão 5.01). A comparação entre 2 grupos foi realizada pelo teste t-Student e a comparação entre 3 ou mais grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) foi considerado para todas as análises.

*Resultados*

Para a realização dos ensaios dependentes da interação neutrófilo – endotélio, primeiramente foi feita uma curva de concentração dos estímulos. Essa curva foi realizada durante a padronização do TBARS (Figuras suplementares 1 e 2). A partir dessa curva foram escolhidas as seguintes concentrações: Zimosan/SHN 1 mg, F(ab')<sub>2</sub>/SHN 20 µg e fMLP 10<sup>-6</sup> M.

### 5.1. Genotipagem do HNA-4a (CR3)

A Figura 5 representa um gel de agarose contendo produtos de PCR para a pesquisa do polimorfismo rs1143679 do gene *ITGAM*. O produto da PCR para ambas os alelos (77R e 77H) corresponde a 124 pb.

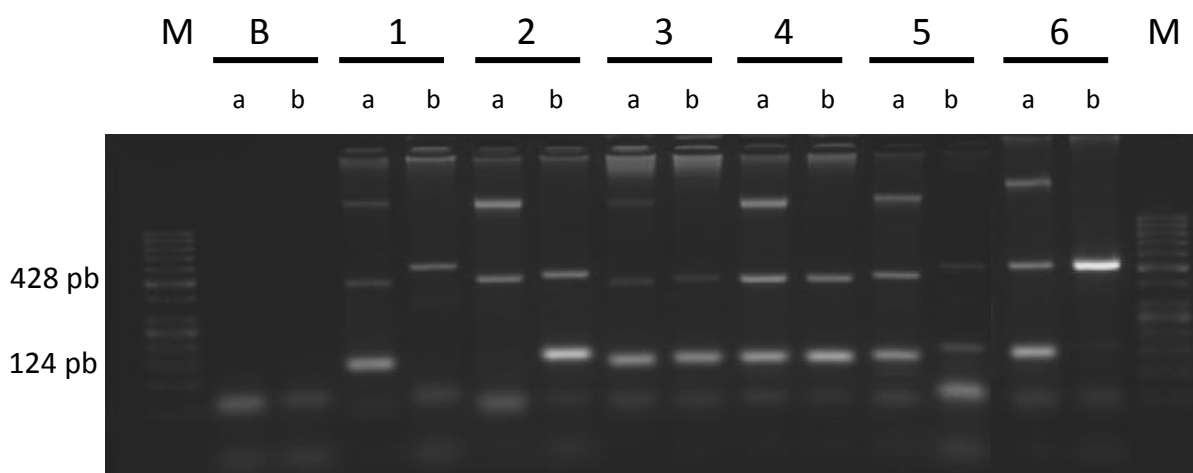


Figura 5. Produtos de PCR para o polimorfismo rs1143679 do gene *ITGAM* representados pelos genótipos de seis indivíduos (1 ao 6). Corrida eletroforética em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,3 e coloração com GelRed. M, marcador de pares de bases de 50pb; B, branco (amostra sem DNA); a, oligonucleotídeos para amplificação do 77R; b, oligonucleotídeos para a amplificação do 77H; 1 e 6, homozigose para 77R; 2, homozigose para 77H; 3 – 5 heterozigose R77H. Foto de N. C. Canicoba.

### 5.2 Avaliação da purificação dos neutrófilos

Uma alíquota da suspensão de neutrófilos foi misturada volume a volume com plasma humano e submetida à citocentrifugação. Em seguida a lâmina com as células



foi submetida à coloração panótica. A Figura 6 representa a população celular encontrada após a purificação, a qual forneceu cerca de 90% de neutrófilos.

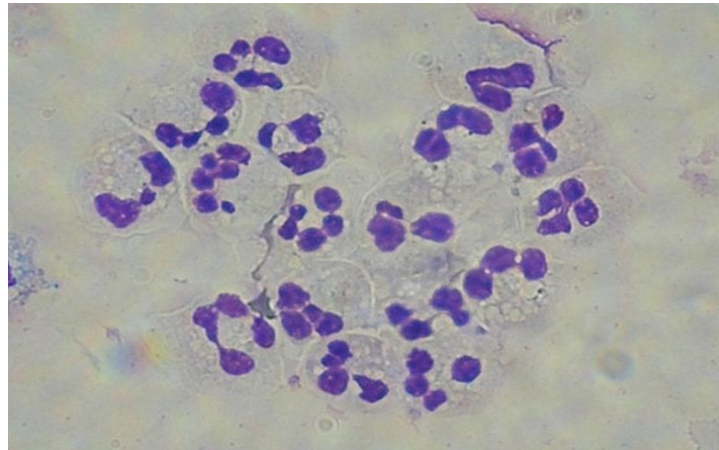


Figura 6. Neutrófilos purificados pelo método da gelatina, submetidos à citocentrifugação e corados por corante panótico. Imagem de microscopia óptica comum (1000X). Foto de N.C. Canicoba.

### 5.3 Quantificação do CD31

A Figura 7 apresenta os histogramas de fluorescência para o CD31. Os controles de autofluorescência, células na ausência dos anticorpos, (Figura 7A) e o isotipo controle (anticorpo inespecífico) (Figura 7B), estão representados. Noventa e cinco por cento das células endoteliais utilizadas nos ensaios expressaram CD31 (Figura 7C).

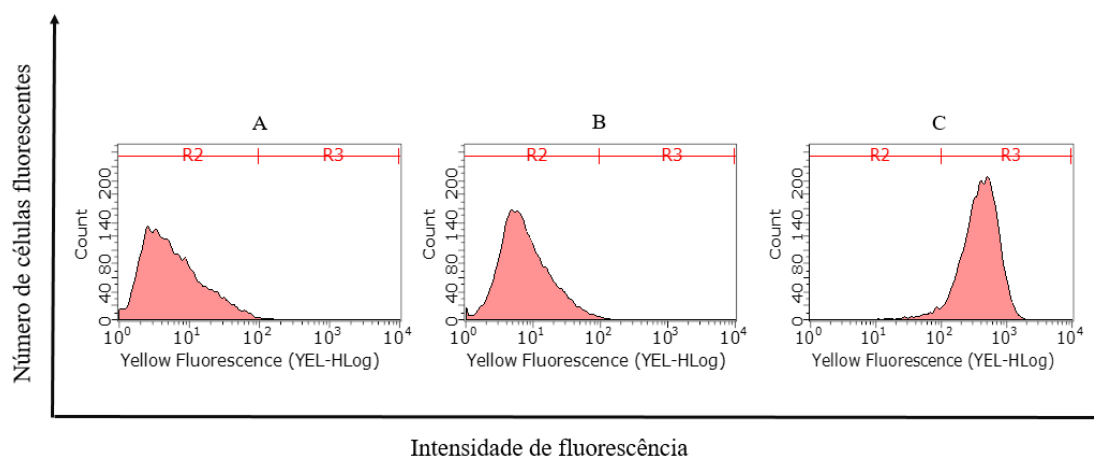


Figura 7: Representação dos histogramas de fluorescência para a identificação do CD31 nas células endoteliais. Analisada por citometria de fluxo. A, autofluorescência; B, anticorpo não-específico marcado com ficoeritrina (PE); C, anticorpo anti-CD31 marcado com PE.

#### 5.4 Ensaio da avaliação de peroxidação lipídica – Marcador de lesão endotelial

O cálculo da medida da peroxidação lipídica das células endoteliais foi realizado utilizando-se uma curva padrão de malonaldeído (Figura suplementar 4).

A avaliação da influência da variante da cadeia CD11b do CR3 na peroxidação lipídica das células endoteliais expostas aos neutrófilos, com ou sem estímulos, está apresentada na Figura 8. Devido à baixa frequência de homozigose para o gene 77H, os neutrófilos dos indivíduos homozigotos para 77H e heterozigotos R77H foram reunidos em um único grupo, representando a presença da variante 77H (Ne/R77H/77H). Na ausência de estímulos (condições A, B e C na Figura 8) observou-se uma maior medida da peroxidação lipídica por neutrófilos Ne/R77H/77H quando comparada às CE sem neutrófilos ( $p < 0,01$ ) e ao grupo CE + Ne/77R ( $p < 0,05$ ).

Quando as CE foram expostas aos neutrófilos com diferentes estímulos, a peroxidação lipídica foi maior para os estímulos Zi/SHN,  $F(ab')_2$ /SHN e fMLP quando comparados com seus respectivos controles de CE+Ne sem estímulo ( $p < 0,001$ ; não representado na Figura 8). Ao contrário, todos os resultados com a exposição das CE aos estímulos tratados com SHI, sem a participação do CR3, não foram diferentes dos seus respectivos controles CE+ Ne ( $p > 0,05$ ; não representado na Figura 8).

As comparações entre os grupos Ne/77R e Ne/R77H/77H foram feitas para

cada estímulo, descontando-se a medida do seu respectivo controle CE+Ne. Observou-se uma maior peroxidação lipídica no grupo Ne/77R para os estímulos  $F(ab')_2$ /SHN e fMLP em comparação com estes mesmos estímulos no grupo Ne/R77H/77H ( $p < 0,05$  para ambos). Para as comparações entre os grupos de neutrófilos com os estímulos tratados com SHI, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). E quando os estímulos tratados com SHN foram comparados com aqueles tratados com SHI, tanto Zi quanto  $F(ab')_2$ , considerando-se a mesma população de neutrófilos, o tratamento com SHI reduziu significativamente a peroxidação lipídica observada com a presença do SHN ( $p < 0,001$  para ambos Zi e  $F(ab')_2$ ).

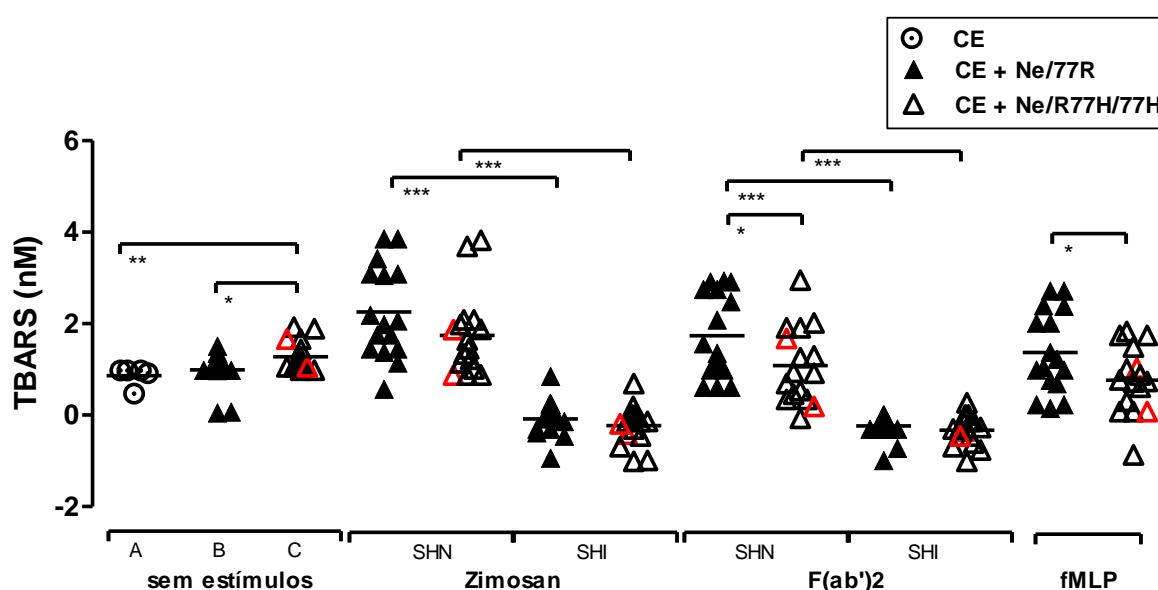


Figura 8. Medida da lesão endotelial. Quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células endoteliais expostas aos neutrófilos. As células endoteliais e os neutrófilos, expressando as variantes polimórficas R77H, foram mantidos em contato por 30 minutos à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A medida de TBARS foi realizada no sobrenadante em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado utilizando a absorvidade molar do MDA ( $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em nM de TBARS. As barras representam as médias da concentração de TBARS de cada grupo. Os pontos representam os neutrófilos de cada um dos indivíduos em cada grupo. Diferenças significativas: \* $p < 0,05$  para A x C e \*\* $p < 0,01$  para B x C (One-way ANOVA e pós-teste de Tukey); \* $p < 0,05$  para  $F(ab')_2$ /SHN em Ne/77R x Ne/R77H/77H e \* $p < 0,05$  para fMLP em Ne/77R x Ne/R77H/77H (teste t-Student); \*\*\* $p < 0,001$  para Zi/SHN x Zi/SHI em Ne/77R, para Zi/SHN x Zi/SHI em Ne/R77H/77H, para  $F(ab')_2$ /SHN x  $F(ab')_2$ /SHI em Ne/77R, para  $F(ab')_2$ /SHN x  $F(ab')_2$ /SHI em Ne/R77H/77H (teste t-Student). CE, células endoteliais;  $F(ab')_2$ , fragmento bivalente de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; Ne, neutrófilo; SHI, soro humano inativado; SHN, soro humano normal. Os valores dos estímulos foram descontados das respectivas espontâneas CE+Ne (B ou C). Os valores para os neutrófilos dos indivíduos com homozigose para 77H estão destacados em vermelho ( $\Delta$ ) dentro de cada grupo.

## 5.5 Ensaio da MPO no sobrenadante das culturas de células endoteliais

Para avaliar a liberação de MPO para o meio contendo células endoteliais, foi feita a medida indireta de MPO no sobrenadante de células endoteliais expostas aos neutrófilos. Porém, o ensaio não foi sensível o bastante para detectar essa enzima. Acredita-se que o principal motivo tenha sido a concentrações de células utilizadas no ensaio de exposição aos neutrófilos. Elas eram muito baixas para a detecção de MPO através desse método e aumentá-las era inviável para a realização de todos os ensaios. Outras metodologias serão testadas para a avaliação deste ensaio.

## 5.6 Transferência de MPO para as células endoteliais expostas aos neutrófilos

A transferência de MPO dos neutrófilos para as células endoteliais foi avaliada por ensaio de citometria de fluxo utilizando-se um anticorpo anti-MPO. A Figura 9 representa os citogramas bidirecionais, indicando a população escolhida para análise (P1 – Figura 9A) e que a maioria da população escolhida são de células endoteliais com marcação positiva para anti-CD31 (IgG FITC) e negativa para CD16 (IgG PE) (Quadrante 4 – Figura 9B).

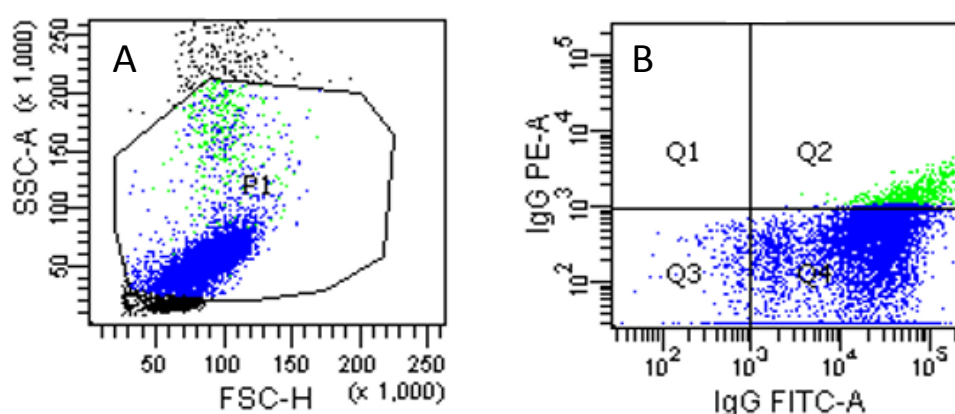
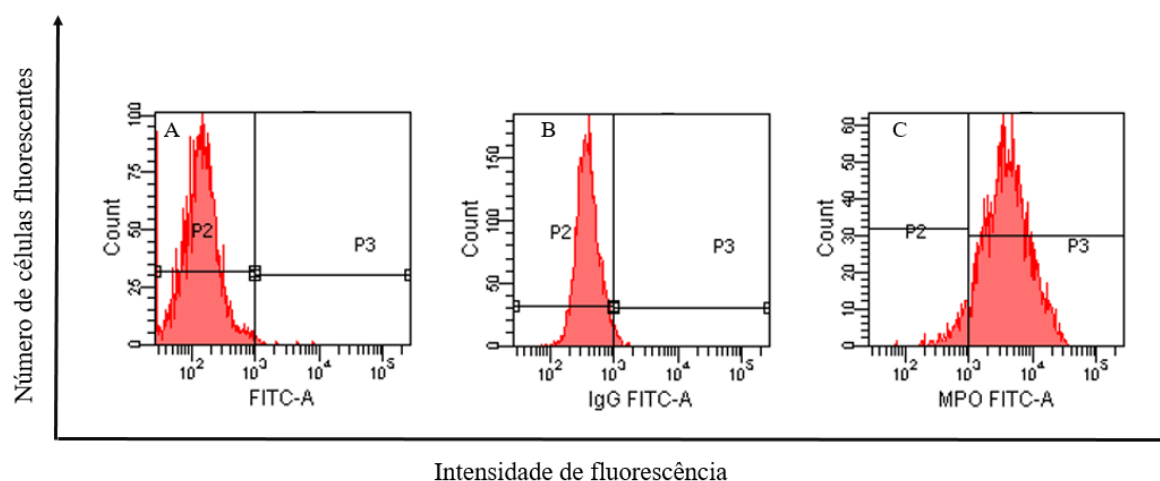


Figura 9. Citogramas bidirecionais demonstrando a população de células analisadas. O citograma A representa a população total escolhida para a análise (gate P1). O citograma B representa a caracterização da maioria da população P1 como células endoteliais, positivas para CD31 (IgG FITC anti-CD31 no quadrante (Q)4) e negativas para CD16 (IgG PE).

A Figura 10 apresenta os histogramas de fluorescência para a medida da transferência da MPO para as células endoteliais. Os controles de autofluorescência, células na ausência dos anticorpos, (Figura 10A) e o isotipo controle (anticorpo inespecífico) (Figura 10B), estão representados. A Figura 10C representa um histograma da marcação positiva para MPO transferida para as células endoteliais.



Experiment Name: Natalia intra 130416						
Specimen Name: Paciente 1						
Tube Name: Tube_002						
Record Date: Apr 13, 2016 9:57:15 AM						
Population	Parent N...	#Events	%Parent	%Total	MPO FIT... Mean	MPO FIT... Median
■ All Events	####	10,000	####	100.0	8,724	5,594
■ P1	All Events	2,910	29.1	29.1	5,234	3,750
☒ P2	P1	179	6.2	1.8	652	683
☒ P3	P1	2,731	93.8	27.3	5,534	4,010

Figura 10. Representação dos histogramas de fluorescência para a quantificação de mieloperoxidase transferida pelos neutrófilos para as células endoteliais (A, B e C) e do painel de dados registrados (número de eventos/células analisadas; % de células positivas para MPO, média e mediana de fluorescência por célula. (D) no citômetro de fluxo. A, autofluorescência; B, anticorpo isotipo controle marcado com FITC; C, anticorpo anti-MPO marcado com FITC. MPO, mieloperoxidase; FITC, isotiocianato de fluoresceína.

A Figura 11 apresenta a porcentagem de células endoteliais fluorescentes (Figura 11A), as quais foram positivas para a ligação do anti-MPO, e a mediana de intensidade de fluorescência por célula (Figura 11B).

A porcentagem representa, em número relativo, a transferência da MPO pelos neutrófilos para as células endoteliais. Na Figura 11 A os dados mostram que o controle foi avaliado pela exposição de CE aos Ne/77R e aos NE/R77H/77H sem estímulos e que não houve diferença entre estes controles. A comparação entre os Ne/77R e os Ne/R77H/77H com os estímulos tratados com SHI também não apresentaram diferenças entre os grupos de neutrófilos, nem quando comparados aos seus respectivos controles sem estímulo. A comparação dos diferentes estímulos ZI/SHN, F(ab')<sub>2</sub>/SHN e fMLP com seus respectivos estímulos entre os grupos Ne/77R e Ne/R77H/77H também não mostrou diferença entre os diferentes neutrófilos.

Entretanto, para os estímulos tratados com SHN a transferência de MPO foi menor para ambos os grupos de Ne, tanto para o Zi quanto para o F(ab')<sub>2</sub>, quando comparados com os respectivos controles sem estímulo e com os respectivos estímulos tratados com SHI, para comparações dentro da mesma população de neutrófilos (\*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,0001, ver comparações na Figura 11A). Este resultado mostra o envolvimento do CR3 na transferência da MPO para as células endoteliais, uma vez que a transferência volta aos valores basais (espontâneos, CE+ Ne sem estímulos) quando da ausência de C3bi (estímulos tratados com SHI).

A Figura 11B representa um gráfico das medianas de intensidade de fluorescência por célula para as células endoteliais marcadas com anti-MPO. Não houve diferença significativa entre os grupos.

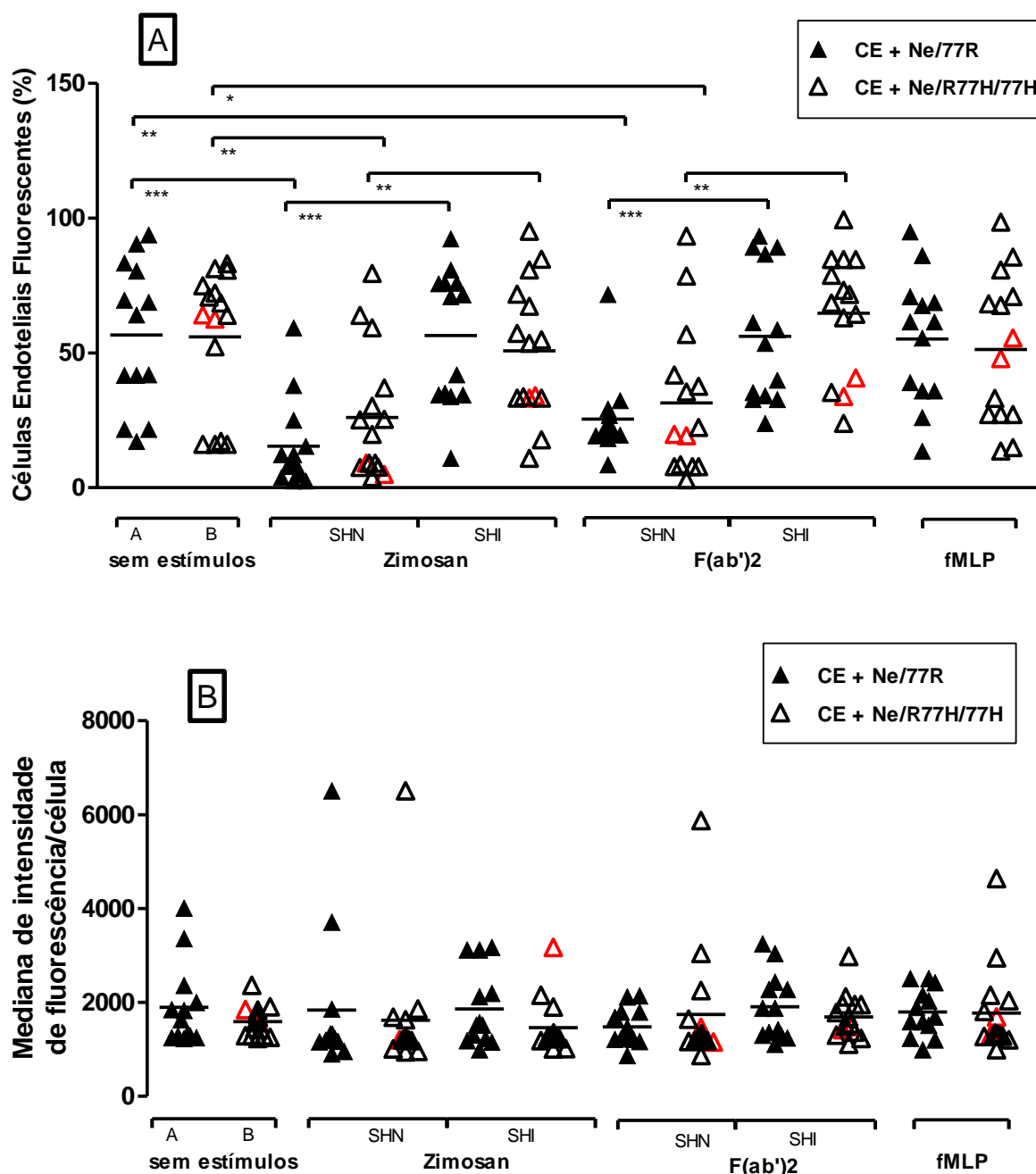


Figura 11. Transferência de mieloperoxidase pelos neutrófilos para as células endoteliais avaliada por citometria de fluxo. A- Porcentagem de células fluorescentes marcadas com anti-MPO. B- Mediana de intensidade de fluorescência por célula. As células endoteliais e os neutrófilos, expressando as variantes polimórficas R77H, foram mantidos em contato por 30 minutos à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram lavadas com PBS pH 7,2, acrescidas de tripsina, transferidas para meio de cultura e centrifugadas. Ao *pellet* foi adicionada a solução de paraformaldeído 1% (para fixar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, o *pellet* foi tratado com a solução de triton X-100 0,02% (para permeabilizar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. As amostras foram marcadas com anticorpo anti-MPO ou isotipo marcados com FITC e lidas no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células

fluorescentes. As barras representam as médias da porcentagem de fluorescência de cada grupo. Os pontos representam os neutrófilos de cada um dos indivíduos em cada grupo. Diferenças significativas: Diferenças significativas (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , teste t-Student). F(ab')<sub>2</sub>, fragmento de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; CE, células endoteliais, Ne, neutrófilo. CE, células endoteliais; F(ab')<sub>2</sub>, fragmento bivalente de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; MPO, mieloperoxidase; Ne, neutrófilo; SHI, soro humano inativado; SHN, soro humano normal. Os valores para os neutrófilos dos indivíduos com homozigose para 77H estão destacados em vermelho ( $\Delta$ ) dentro de cada grupo.

### 5.7 Expressão de ICAM-1

A Figura 12 apresenta a quantificação de ICAM-1 solúvel proveniente das células endoteliais expostas aos neutrófilos dos diferentes genótipos e com estímulos diferentes. Houve diferença significativa para o estímulo Zi/SHN quando os Ne/77R e os Ne/R77H/77H foram comparados com seus respectivos controles sem estímulos (somente CE + Ne) (\*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$ , respectivamente). Para o estímulo com F(ab')<sub>2</sub>/SHN somente os Ne/77R mostraram maior valor para ICAM-1 solúvel comparado ao seu respectivo controle (CE + Ne) ( $p < 0,05$ ) e houve diferença entre F(ab')<sub>2</sub>/SHN e F(ab')<sub>2</sub>/SHI no grupo dos Ne/77R ( $p < 0,05$ ).

A curva padrão para o cálculo da concentração de ICAM-1 solúvel está apresentada como Figura suplementar 5.



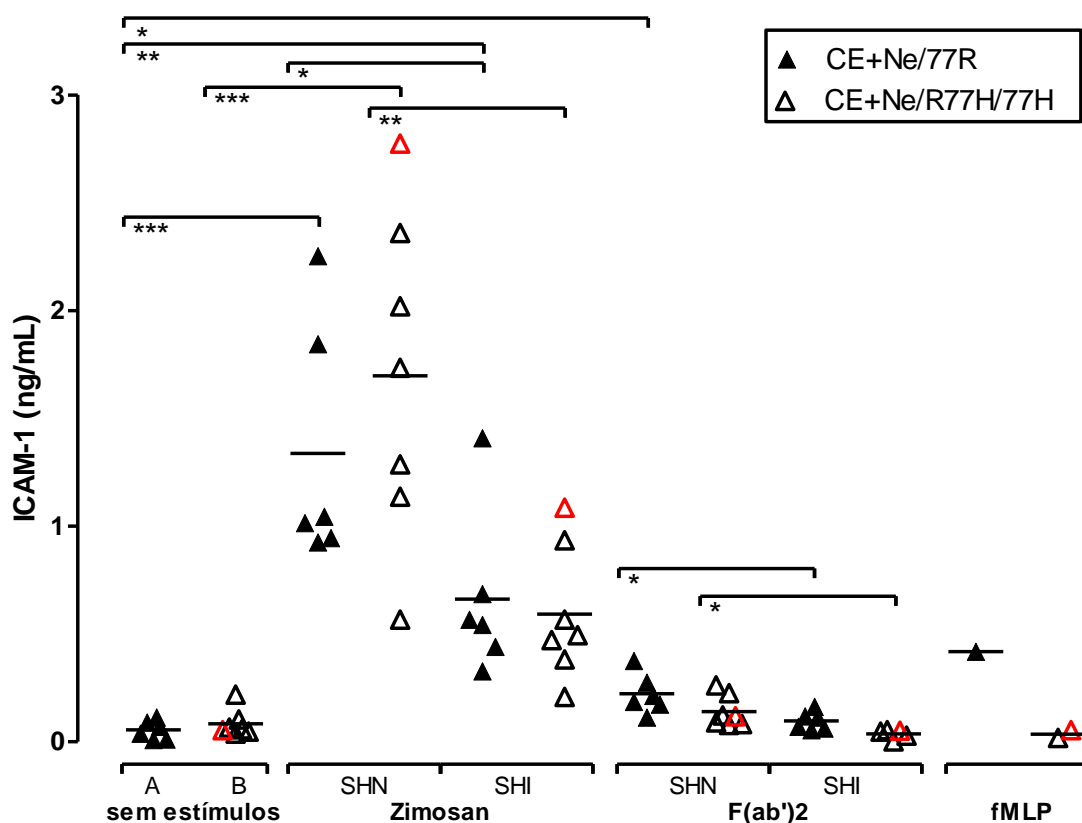


Figura 12. ICAM-1 solúvel como marcador de ativação endotelial. Quantificação da concentração de ICAM-1 liberada pelas células endoteliais expostas aos neutrófilos. As células endoteliais e os neutrófilos, expressando as variantes polimórficas R77H, foram mantidos em contato por 30 minutos à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e uma alíquota deste foi utilizada para o ensaio de ELISA (kit R&D system). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm, com correção a 540 nm. O cálculo da concentração de ICAM-1 foi realizado a partir de curva padrão e os resultados estão apresentados em ng/mL. As barras representam as médias da concentração de ICAM-1 de cada grupo. Os pontos representam os neutrófilos de cada um dos indivíduos em cada grupo. Diferenças significativas \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; teste t-Student e *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey. CE, células endoteliais; F(ab')<sub>2</sub>, fragmento bivalente de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; MPO, mieloperoxidase; Ne, neutrófilo; SHI, soro humano inativado; SHN, soro humano normal. Os valores para os neutrófilos dos indivíduos com homozigose para 77H estão destacados em vermelho ( $\Delta$ ) dentro de cada grupo.

*Discussão*

O CR3 é uma integrina considerada pró-inflamatória devido a sua habilidade de promover a fagocitose e melhorar a função de diversas moléculas efetoras, como o CD14 e o Fc $\gamma$ R (Rosetti, Mayadas, 2016). Estudos revelaram que essa molécula também tem um papel fundamental na imunoregulação e que suas variantes podem conferir risco para indivíduos com doenças autoimunes, como o LES. Isso porque o polimorfismo do CR3 pode levar a uma diminuição da atividade dessa integrina em neutrófilos, células B e macrófagos (Ding *et al.*, 2013; Rosetti, Mayadas, 2016).

O polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 tem sido associado à suscetibilidade a danos em órgãos no LES. Essa integrina interfere na adesão mediada por Fc $\gamma$ R e promove o acúmulo de neutrófilos em modelos de nefrite (Rosetti, Mayadas, 2016).

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia dos receptores para IgG e de complemento no LES (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Marzocchi-Machado *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008). Algumas alterações foram descritas com relação a alterações de expressão e de funções mediadas por eles, assim como a influência dos seus polimorfismos genéticos nas funções efetoras dos neutrófilos e na suscetibilidade ao LES (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014; Vigato-Ferreira *et al.*, 2014). Seguindo essa linha de investigação, o grupo vem trabalhando para buscar o entendimento de como estas alterações podem de fato ter implicações para as interações neutrófilos-endotélio e resultar em dano tecidual, em particular, no LES, que é o protótipo de doença por imunocomplexo.

Embora a associação do polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* com a suscetibilidade ao LES tem sido descrita para várias populações em todo o mundo (Vigato-Ferreira, 2012; Toller-Kawahisa *et al.*, 2013), os mecanismos pelos quais a variante 77H, codificada pelo alelo de risco, pode influenciar o aparecimento e a fisiopatologia do LES ainda não são conhecidos.

Alguns autores têm descrito algumas alterações funcionais mediadas pela variante 77H, contudo o número de trabalhos ainda é escasso (Macpherson *et al.*, 2011; Rosetti, Mayadas, 2016) e há diversidade de modelos experimentais que dificulta o entendimento da variante como um fator de risco. Considerando-se a diversidade e a importância dos mecanismos fisiológicos mediados pelo CR3, bem como seu envolvimento nas respostas efetoras envolvidas diretamente com *clearance* de imunocomplexos e o processo inflamatório, não é difícil compreender a associação de um polimorfismo neste receptor com a fisiopatologia do LES. Mas o fato é que

diante dos múltiplos fatores associados ao LES e à complexidade da sua fisiopatologia, estabelecer um modelo sistemático para dissecar o(s) mecanismo(s) exato(s) de como a variante 77H está relacionada ao LES ainda é um desafio para os cientistas. Sobretudo porque - embora o risco relativo significativo do alelo H seja evidente - a maioria dos pacientes é portadora do alelo em heterozigose e a frequência da homozigose, aumentada também no LES em relação aos sujeitos saudáveis, é ainda muito baixa e difícil para se estabelecer um estudo de coorte com pacientes homozigotos para o alelo 77H (Vigato-Ferreira, 2014; Toller-Kawahisa *et al.*, 2014).

Recentemente, nosso grupo também descreveu a associação do polimorfismo rs1143679 do *ITGAM* com a suscetibilidade ao LES e com a ocorrência de nefrite nestes pacientes (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014). Uma vez que nós temos estudado mecanismos efetores envolvidos com o *clearance* de IC, mediados pelos FcγR e/ou CR, em pacientes com LES, neste trabalho nós estabelecemos um modelo para investigar a influência da variante da cadeia do CD11b do CR3 para as interações entre neutrófilos e endotélio.

Para isso, foi estabelecido um modelo para a exposição de células endoteliais à interação com neutrófilos. A ativação dos neutrófilos foi desencadeada pela presença de ligantes para o CR3 - o C3bi opsonizando os estímulos zimosan (ZI/SHN) e IC contendo F(ab')<sub>2</sub>/SHN. Como controle positivo da ativação dos neutrófilos, o peptídeo fMLP foi utilizado como estímulo independente do CR3. Com a finalidade de entender a biologia da variante 77H, excluindo-se as variáveis da doença, o modelo foi desenvolvido com neutrófilos de indivíduos aparentemente saudáveis. A partir deste modelo podemos pensar em delineamentos envolvendo neutrófilos de pacientes com LES, bem como estudar potenciais drogas moduladoras das respostas envolvendo o CR3.

A avaliação da peroxidação lipídica mostrou que os neutrófilos expressando a variante 77H (grupo Ne/R77H/77H) produziram maior agressão ao endotélio quando comparados aos neutrófilos expressando a variante 77R mesmo na ausência de estímulos. Quando os estímulos contendo ligantes para CR3 foram utilizados, a agressão ao endotélio foi significativamente maior para todos os estímulos e grupos de neutrófilos comparados aos seus controles sem estímulos. Os resultados sugerem que a agressão ao endotélio, resultando em peroxidação lipídica, é dependente das funções efetoras dos neutrófilos e interações com o endotélio via CR3, porque ela foi

reduzida significativamente quando os estímulos foram tratados com soro desprovido de complemento. Isto é, a remoção do ligante C3bi para o CR3 diminuiu a peroxidação voltando aos níveis daquela observada somente com células endoteliais e neutrófilos, algumas vezes até menor, sugerindo que as partículas de Zimosan e de  $F(ab')_2$  sem C3bi poderiam estar causando um efeito de impedimento físico para a agressão espontânea vista nos controles sem estímulo.

Entre os grupos de neutrófilos, aqueles expressando a variante 77R produziram maior peroxidação lipídica nas células endoteliais quando comparados aos neutrófilos com a variante 77H para a estimulação com  $F(ab')_2$ /SHN e para fMLP. Embora não houve diferença entre os grupos de neutrófilos para o estímulo Zi/SHN, os valores observados para o grupo de neutrófilos expressando a variante 77R mostraram uma tendência a ser maior do que no outro grupo, com o mesmo perfil de distribuição dos dados apresentados para  $F(ab')_2$ /SHN e para fMLP. Um número maior de amostras poderia possibilitar a definição desta tendência. Sobretudo, porque a diferença foi significativa quando testamos análise não paramétricas. Contudo, devido ao número relativamente baixo de heterozigose para 77H no grupo, optou-se por análises paramétricas.

Quanto a avaliação da liberação de MPO pelos neutrófilos e internalização dessa enzima pelas células endoteliais, os resultados mostraram que não houve diferença entre os neutrófilos, porém, na presença de estímulos opsonizados com SHN e SHI houve diferença estatisticamente significativa. Esse teste também confirmou o que foi visto em Jerke *et al.* (2013). Quando há contato entre célula endotelial e neutrófilo sem estímulo, a internalização de MPO é mais alta do que quando o neutrófilo é estimulado. Além disso, também confirmamos que quando utilizamos placas *transwell* a transferência de MPO para as células endoteliais é reduzida, ratificando a importância do contato célula endotelial e neutrófilo para a interação via CR3 e seu ligante no endotélio. Cabe destacar que a transferência de MPO para a célula endotelial parece ser dependente da disponibilidade do CR3 no neutrófilo, porque a transferência da MPO foi menor quando os neutrófilos foram estimulados com Zi/SHN e com  $F(ab')_2$ /SHN, voltando ao normal (espontâneo) quando Zi e  $F(ab')_2$  foram tratados com SHI, mas não foi alterado pela estimulação com fMLP – um estímulo para neutrófilo independente de CR3.

A quantificação de ICAM-1 solúvel representa um marcador de ativação das células endoteliais. Os resultados demonstraram diferença na presença de neutrófilos estimulados com Zi/SHN. Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Van Buul *et al.* (2010), os quais analisaram a liberação de ICAM-1 durante a inflamação e observaram níveis mais elevados de ICAM-1. A concentração de ICAM-1 foi maior tanto para o Zi/SHN quanto para o F(ab')<sub>2</sub>/SHN, mas com uma maior significância estatística para o Zi/SHN quando comparado ao controle (CE e neutrófilo) para o grupo de neutrófilos expressando a variante 77R. As comparações entre os estímulos F(ab')<sub>2</sub>/SHN no grupo de neutrófilos com a variante 77H não mostraram diferenças. As variações entre Zi/SHN e F(ab')<sub>2</sub> podem ser reflexo das características do arranjo molecular destes complexos insolúveis. Por esta avaliação, observou-se que os estímulos dependentes de CR3 promoveram um aumento da ativação endotelial, a qual foi significativamente reduzida quando os estímulos foram privados da presença de C3bi para o CR3 (estímulos tratados com SHI).

Dentre os poucos trabalhos que têm buscado investigar a influência do polimorfismo da cadeia CD11b nas funções efetoras dos neutrófilos mediadas por CR3, a fim de explicar a suscetibilidade ao LES, Fossati-Jimack e colaboradores (2013) observaram que a fagocitose mediada por CR3 é afetada pelo polimorfismo do CD11b. Porém, estes estudos foram baseados em um modelo de células transfectadas com a variante CD11b e também não incluíram células de pacientes com LES nos ensaios.

O nosso grupo observou que a presença da variante 77H da cadeia CD11b prejudica a cooperação do CR3 com o Fc $\gamma$ R quanto ao *burst* oxidativo de neutrófilos de pacientes com LES, quando estimulados por IC (Toller-Kawahisa *et al.*, 2013), bem como que a variante 77H está associada à nefrite lúpica (Toller-Kawahisa *et al.*, 2014).

A MPO é a enzima mais abundante dos neutrófilos e é liberada durante a desgranulação como um importante sistema oxidante microbicida. Porém, ela também está associada a diversas enfermidades como arteriosclerose, enfarte do miocárdio, fibrilação arterial, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, câncer de pulmão e rejeição de transplantes (Pulli *et al.*, 2013). Além disso, a ação enzimática da MPO pode estar direta ou indiretamente relacionada na patogênese dessas doenças, fazendo com que compostos derivados de MPO estejam sendo usados como biomarcadores para avaliar a progressão de doenças (Klinke *et al.*, 2011; Zhang *et al.*,

2013). A deposição da MPO no endotélio pode levar à geração de oxidantes no local, atrair e ativar mais neutrófilos, acelerando e amplificando o processo inflamatório. E dessa forma estabelecer um sinergismo de mecanismos que os modelos experimentais ainda não reproduziram para o estudo do papel da variante 77H da cadeia CD11b do CR3.

A ativação do complemento e, por consequência, a opsonização do estímulo ativa a desgranulação do neutrófilo. Metzler e colaboradores (2014) observaram que a MPO é necessária para a translocação do neutrófilo durante a formação de NET (*neutrophil extracellular traps*). Assim, durante a desgranulação do neutrófilo, grande parte da MPO não consegue ser transferida para a célula endotelial, pois está atuando, seja através dos seus ciclos de halogenação/peroxidação nos fagolisossomos ou da formação das NETs. Para o ICAM-1 o efeito seria contrário. A ativação do complemento e, por consequência, a opsonização do estímulo aumenta a liberação dessa molécula. Acreditamos que isso se deve ao fato da desgranulação do neutrófilo liberar os conteúdos dos grânulos, agravando a inflamação, e aumentando a expressão de ICAM-1 pelo endotélio.

Um ensaio adicional para comprovar que a transferência de MPO para o endotélio é dependente do contato deste com o neutrófilo foi realizado utilizando-se placas *transwell*, que impede o contato da célula endotelial como os neutrófilos, mas possibilita a passagem de mediadores solúveis pelos poros da placa que separa as duas células. O nosso ensaio também confirmou o que foi descrito por Jerke e colaboradores (2013). O neutrófilo não precisa de estímulos para transferir MPO para a célula endotelial essa transferência é dependente do contato entre neutrófilos e célula endotelial. Segundo Jerke *et al.* (2013), quando placas *transwell* são utilizadas, a internalização da MPO pelas células endoteliais não ocorre. O nosso ensaio corrobora com essa observação, pois a transferência de MPO foi quase nula (Figura suplementar 3).

No caso do LES, a deposição da MPO no endotélio pode levar à geração de oxidantes no local, atraindo e ativando mais neutrófilos, e por consequência, amplificando o processo inflamatório (Jerke *et al.*, 2013). Para que essa deposição ocorra, é necessário o contato direto entre neutrófilo e endotélio, sendo que o CR3 é a principal molécula envolvida nesse processo (Jerke *et al.*, 2013).

Estudos vêm demonstrando o papel regulador do CR3 e da MPO quanto a apoptose de neutrófilos. El Kebir e colaboradores (2008) observaram que a MPO pode influenciar a sobrevivência e a apoptose de neutrófilos *in vitro*. Essa enzima se liga ao CD11b, induzindo a fosforilação da proteína quinase B. Isso resulta em um atraso no processo de apoptose, apresentando um efeito pró-inflamatório. Além disso, Forsberg e colaboradores (2001) demonstraram que o TNF- $\alpha$  pode potencializar o *burst* oxidativo dos neutrófilos. Ao primar neutrófilos com TNF- $\alpha$  foi observado que ocorria uma alteração na cinética de produção de ERO e que o tempo para alcançar o máximo da produção de ERO era reduzido pela metade em neutrófilos primados.

Outros estudos no nosso grupo têm mostrado que expressão do CR3 nos neutrófilos não está alterada na superfície dos neutrófilos saudáveis e nem de LES, considerando a comparação saúde x doença e também variante 77R x 77H (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002; Toller-Kawahisa, 2012). Estes resultados estão em consonância com aqueles descritos por Fossati-Jimack e colaboradores (2013), com aqueles modelos de células transfectadas (Macpherson *et al.*, 2011) e por modelos com neutrófilos humanos (Zhou *et al.*, 2013). Tais resultados nos permitem sugerir que o polimorfismo R77H da cadeia CD11b não interfere na expressão do CR3.

Considerando as interações entre neutrófilo e endotélio mediadas pelo CR3 e a internalização de MPO pelas células endoteliais, o nosso estudo contribui como um modelo para investigar a influência da variante 77H na biologia das funções mediadas pelo CR3. E, posteriormente, somar e aplicar o conhecimento para a compreensão da associação deste polimorfismo com a fisiopatologia e suscetibilidade ao LES. Os resultantes obtidos sugerem a dependência das interações entre neutrófilos e endotélio mediadas pelo CR3. Quanto à influência do polimorfismo rs2243679 da cadeia CD11b do CR3 nas funções estudadas, a variante 77R influenciou a peroxidação lipídica, aumentando a agressão ao endotélio por neutrófilos sem estímulos ou com F(ab')<sub>2</sub>/SHN. Há uma tendência à menor peroxidação lipídica e maior transferência de MPO por neutrófilos estimulados com SHN expressando 77H, enquanto que a agressão espontânea ao endotélio por estes neutrófilos foi significativamente maior comparada àquela observada com neutrófilos expressando 77R.

Os resultados refletem a diversidade de mecanismos envolvidos nas interações estudadas e apontam para a necessidade do refinamento dos modelos experimentais



para uma compreensão mais clara.

Estudar os mecanismos imunológicos e moleculares do CR3 e entender como a variante polimórfica 77H pode afetar a função dessa integrina são de grande importância para contribuir na elucidação de terapias para diversas doenças autoimunes.

*Conclusão*

- a)** Os neutrófilos que expressam a variante 77H da cadeia CD11b do CR3 promoveram maior agressão às células endoteliais, medida pela peroxidação lipídica, na ausência de estímulos, quando comparados aos neutrófilos que expressam a variante 77R.
- b)** A peroxidação lipídica foi maior em resposta aos estímulos Zi/SHN e F(ab')<sub>2</sub>/SHN, quando comparada aquela com os mesmos estímulos tratados com soro deficiente de proteínas do sistema complemento (Zi/SHI e F(ab')<sub>2</sub>/SHI), sendo portanto influenciada pela interação C3bi com o CR3.
- c)** Os neutrófilos que expressam a variante 77R promoveram maior peroxidação lipídica das células endoteliais quando comparados aos neutrófilos expressando a variante 77H.
- d)** A transferência de MPO para as células endoteliais é dependente da disponibilidade do CR3, uma vez que ela foi significativamente menor na presença dos estímulos Zi/SHN e F(ab')<sub>2</sub>/SHN, dependentes do CR3, mas não sofreu alteração com o fMLP.
- e)** A transferência de MPO para as células endoteliais depende do contato neutrófilo e célula endotelial.
- f)** Os estímulos dependentes do CR3 promoveram um aumento da ativação endotelial medida pela concentração de ICAM-1 solúvel; a remoção do complemento (SHI) minimiza esta ativação. Não houve diferenças entre os grupos de neutrófilos.
- g)** Os neutrófilos que expressam a variante 77H da cadeia CD11b, quando estimulados via CR3, exibem uma tendência à menor peroxidação lipídica e à maior transferência de MPO para as células endoteliais.
- h)** O modelo do estudo permitiu a confirmação de que todas as funções estudadas são dependentes de CR3.

## *Referências Bibliográficas*

ALARCÓN-SEGOVIA, D. Treatment needed to achieve remission of SLE. **Lupus**. 1999; 8(7):566. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10483038>>.

AMULIC, B.*et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**. 2012; 30:459-89. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224774>>.

ANAYA, J.M.*et al.* Evaluation of genetic association between an *ITGAM* non-synonymous SNP [rs1143679] and multiple autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**. 2012; 11:276–80. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840425>>.

ASHLEY, N.T.*et al.* Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 2012; 43: 385-406. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>>.

ASTERN, J.M. *et al.* Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. **American Journal of Pathology**. 2007;171(1):349-60. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591979>>.

BORREGAARD, N.; COWLAND J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**. 1997; 89:3503–3521. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160655>>.

BORREGAARD, N. *et al.* Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**. 2007; 28(8):340-5. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627888>>.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity Review**. 2011; 24;33(5):657-70. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094463>>.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 1978; 52:302-10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>>.

CAVAILLON, J.M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. **Journal of Leukocyte Biology**. 2011;90(3):413-24. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628329>>.

CHEUNG, K.*et al.* The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology Baltimore**. 1983; 130:2324-2339. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6687603>>.

CLAGUE, H.D.*et al.* Human neutrophil antigen-4a gene frequencies in an Australian population, determined by a new polymerase chain reaction method using sequence-specific primers. **Transfusion Medicine**. 2003; 13:149-52. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791082>>.

DING, H.J.; GORDON, C. M.*et al.* New biologic therapy for systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Pharmacology**. 2013; 13(3):405-12. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664092>>.

DYOBUKT, J.M. *et al.* A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**. 2005; 39:1468–77. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274882>>.

EL KEBIR, D. *et al.* Inflammation: Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**. 2008; 15;103(4):352-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617697>>.

FARIDI, M.H. *et al.* High-throughput screening based identification of small molecule antagonists of integrin CD11b/CD18 ligand binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2010; 26;394(1):194-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188705>>.

FORSBERG, M. *et al.* Tumour necrosis factor-alpha potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. **Immunology**. 2001, 103(4): 465-72. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11529937>>.

FOSSATI-JIMACK, L. *et al.* Phagocytosis is the main CR3-mediated function affected by the lupus-associated variant of CD11b in human myeloid cells. **PLOS One**. 2013, 8(2):57082. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451151>>.

FREIRE, M.O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000. 2013; 63(1):149-64. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931059>>.

GAHMBERG, C.G. *et al.* Regulation of integrin activity and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009; 1790(6):431-44. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289150>>.

GRAHAM, D.B. *et al.* Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLCgamma2 signaling axis in mice. **Journal of Clinical Investigation**. 2007; 117(11):3445-52. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932569>>.

GUILLEVIN L.; DÖRNER, T. Vasculitis: mechanisms involved and clinical manifestations. **Arthritis Research & Therapy**. 2007; 9 Suppl 2:S9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767747>>.

HÄGER, M. *et al.* Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**. 2010; 268(1):25-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497300>>.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Endothelial cell destruction by polymorphonuclear leukocytes incubated with sera from patients with SLE. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. 1992; 21(5):209-14. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1439628>>.

HELEN, L. *et al.* The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology** 2014; 10, 593–601. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914698>>.

JERK, U. *et al.*  $\beta$ 2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**. 2013; 288(18):12910-9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532856>>.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**. 2005; 77(5):598-625. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689384>>.

KLEBANOFF, S.J. *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**. 2013; 93(2):185-98. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066164>>.

KLINKE, A. *et al.* Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**. 2011; 117(4):1350-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980678>>.

KOLACZKOESKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 2013; 13, 159-175. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435331>>.

KRUGER, P. *et al.* Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLOS Pathogens**. 2015; 12;11(3):e1004651. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764063>>.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. 2010; 10(11):1325-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828640>>.

KURIEN, B.T. *et al.* Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. 2006; 41:549–556. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16863987>>.

LAU, D. *et al.* Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2005; 102(2):431-6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625114>>.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. 2006; 111(1):16-26. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476484>>.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**. 2007; 7(9):678-89. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717539>>.

LI, X. *et al.* Fc $\gamma$  receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. **Genes & Immunity**. 2009; 10:380–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421223>>.

- LOZADA, C. *et al.* Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1995; 92:8378–82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545301>>.
- LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**. 1984; 132:2015-20. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6699405>>.
- MA, Y. *et al.* Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. **Fibrogenesis Tissue Repair**. 2013; 3;6(1):11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731794>>.
- MACPHERSON, M. *et al.* A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**. 2011; 286: 17303–17310. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454473>>.
- MARKS, R.M. *et al.* Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. **Nature**. 1989; 339:314–317. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2725646>>.
- 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** 2002; 11:240-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12043888>>.
- MARZOCCHI-MACHADO, C.M. *et al.* CR1 on erythrocytes of Brazilian systemic lupus erythematosus patients: the influence of disease activity on expression and ability of this receptor to bind immune complexes opsonized with complement from normal human serum. **Journal of Autoimmunity**. 2005; 25(4):289-97. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289666>>.
- MAYADAS, T.N. *et al.* Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. **Circulation**. 2009; 17; 120(20):2012-24. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917895>>.
- METZLER, D.C. *et al.* A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. **Cell Reports**. 2014; 7;8(3):883-96. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066128>>.
- MILLER, A.S. *et al.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**. 1988; 16:1215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>>.



- MORAES, T.J. *et al.* Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current Opinion in Hematology**. 2006; 13(1):21-7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319683>>.
- NATH, S.K. *et al.* A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha (M) (encoded by *ITGAM*) is associated with systemic lupus erythematosus. **Nature Genetics**. 2008; 40:152-4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204448>>.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Review Immunology**. 2006; 6(3):173-82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498448>>.
- NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**. 2010; 140(6):871-82. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877>>.
- NAUSEEF, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunology Review**. 2007; 219:88-102. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850484>>.
- PANASENKO, O.M. *et al.* Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems. **Biochemistry (Moscow)**. 2013; 78(13):1466-89. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490735>>.
- PATTERSON, E.K. *et al.* Carbon monoxide-releasing molecule 3 inhibits myeloperoxidase (MPO) and protects against MPO-induced vascular endothelial cell activation/dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine**. 2014; 70:167-73. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583458>>.
- PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **Journal of Experimental Medicine**. 2006; 203(12):2569-75. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116736>>.
- PULLI, B. *et al.* Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLOS One**. 2013; 8(7):e67976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861842>>.
- ROSE, D.M. *et al.* Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. **Immunology Review**. 2007 Aug; 218:126-34. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624949>>.
- ROSETTI, F.; MAYADAS, T.N. The many faces of Mac-1 in autoimmune disease. **Immunology Review**. 2016, Jan 269(1):175-93. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26683153>>.
- SPRONK, P.E. *et al.* Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long-term prospective study. **Clinical & Experimental Immunology**. 1994; 97(3):439-44. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521807>>.

STOCCO, B. *et al.* Drospirenone and levonorgestrel in combination with either 30 or 20 mcg ethinylestradiol reduce soluble adhesion molecules in Brazilian women; cross-sectional study. **Contraception**. 2012; 86(5):506-10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554799>>

THEILGAARD-MÖNCH, K. *et al.* The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. **Journal of Immunology**. 2004; 15;172(12):7684-93. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187151>>.

TOLLER-KAWAHISA, J.E. The variant of CD11b, rs1143679, in CR3 is associated with lupus nephritis and impaired FcγR/CR cooperation in mediating the oxidative burst of neutrophils. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 104p, 2012.

TOLLER-KAWAHISA, J.E. *et al.* The variant of CD11b, rs1143679 within *ITGAM*, is associated with systemic lupus erythematosus and clinical manifestations in Brazilian patients. **Human Immunology**. 2014, 75:119-23. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269694>>.

TROUW, L.A.; DAHA M.R. Role of complement in innate immunity and host defense. **Immunology Letters**. 2011; 138(1):35-7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333684>>.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 2007; 39:44–84. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>.

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. *et al.* FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. **Autoimmunity**, 2014; 47(7):451-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896836>>.

VIGATO-FERREIRA, I.C.C. FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 97p, 2012.

VILLANUEVA, E. *et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. **Journal of Immunology**. 2011; 187(1):538-52. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613614>>.

ZHANG, H. *et al.* Inhibition of myeloperoxidase decreases vascular oxidative stress and increases vasodilatation in sickle cell disease mice. **Journal of Lipid Research**. 2013; 54(11):3009-15. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956444>>.

ZHOU, Y. *et al.* Multiple lupus-associated *ITGAM* variants alter Mac-1 functions on neutrophils. **Arthritis Rheumatology**. 2013, 65(11): 2907-16. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918739> >.

*Material Suplementar*

### 9.1. Desenho do *primer*

Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p2 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC\_000016.10

<[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_000016.10?report=fasta&from=29909613&to=31438697](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000016.10?report=fasta&from=29909613&to=31438697)>

FASTA Showing 401 bp region from base 31265290 to 31265690.

GenBank Graphics

>gi|568815582:31265290-31265690 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p2

Primary Assembly

ATCCGGGTATGGGCCCCACCGTCCTCTGGGTGGCAGAACTTCCTCTGTGGTC  
 TCCTTCTCTCCCCACATGTCGAAGTTTTCTCTGTTCCCACTT **CTCCCCACAGGGT**  
**GGTG** GTTGGAGCCCCCAGGAGATAGTGGCTGCCAACCAAAGGGGCAGCCTC  
 TACCAGTGC GACTACAGCACAGGCTCATGCGAGCCCATCC **[G/A]CCTGCAGGG**  
**TGAGTCACT** GCCCCGCCGGGCTGGGACTGGGATTCCTGTGAACACATAGGG  
 ACTTTCCAGGCACTCCTGTGTCCTGGGGATCTGTGGTGGGGACACAGGTGCCT  
 GCCTCCGTACCCTCTCCTCTGCCTGCAGTCTCTACCCTAGACATCCCCAGGCAA  
 CCCCTCTGTGTTCTTTCTTTCCCAAGATTT

SNP rs1143679: destaque amarelo; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=1143679>

Sequência do oligonucleotídeo *sense*: 5' CTC CCC ACA GGG TGG TG 3', grifo em destaque azul;

Sequência complementar aos oligonucleotídeos *anti-sense* grifo dentro da sequência do snp, que aparece em destaque amarelo:

77H: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG C 3'

77R: 5' AGT GAC TCA CCC TGC ATG T 3'.

A substituição de G por **T** nas sequências dos oligonucleotídeos *anti-sense* (destaque verde) foram feitas para aumentar a especificidade.

## 9.2 Figuras suplementares

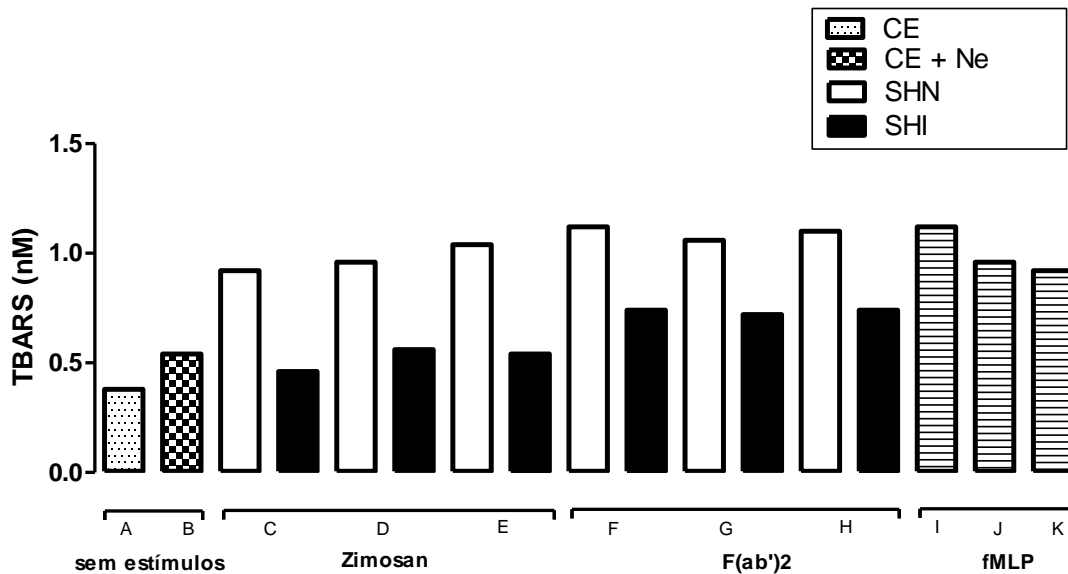


Figura suplementar 1. Quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células endoteliais. As células endoteliais foram expostas a neutrófilos expressando as variantes 77R ou 77H por 30 minutos à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram lavadas com PBS pH 7.2, acrescidas de tripsina, transferidas para eppendorf contendo meio de cultura e centrifugadas. Ao pélete foi adicionado o reagente de TBARS. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado utilizando a absorvidade molar do MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em nM de TBARS. As barras representam a padronização do ensaio. F(ab')<sub>2</sub>, fragmento de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; CE, células endoteliais, Ne, neutrófilo. Os valores dos estímulos foram descontados da respectiva espontânea CE+Ne (B). A, CE; B, CE+Ne; C, Zi 1 mg; D, Zi 1,3 mg; E, Zi 2 mg; F, F(ab')<sub>2</sub> 30 µg; G, F(ab')<sub>2</sub> 45 µg; H, F(ab')<sub>2</sub> 60 µg; I, fMLP 10<sup>-4</sup> M; J, fMLP 10<sup>-5</sup> M; K, fMLP 10<sup>-6</sup> M. As concentrações escolhidas foram Zi 1 mg e fMLP 10<sup>-6</sup> M.

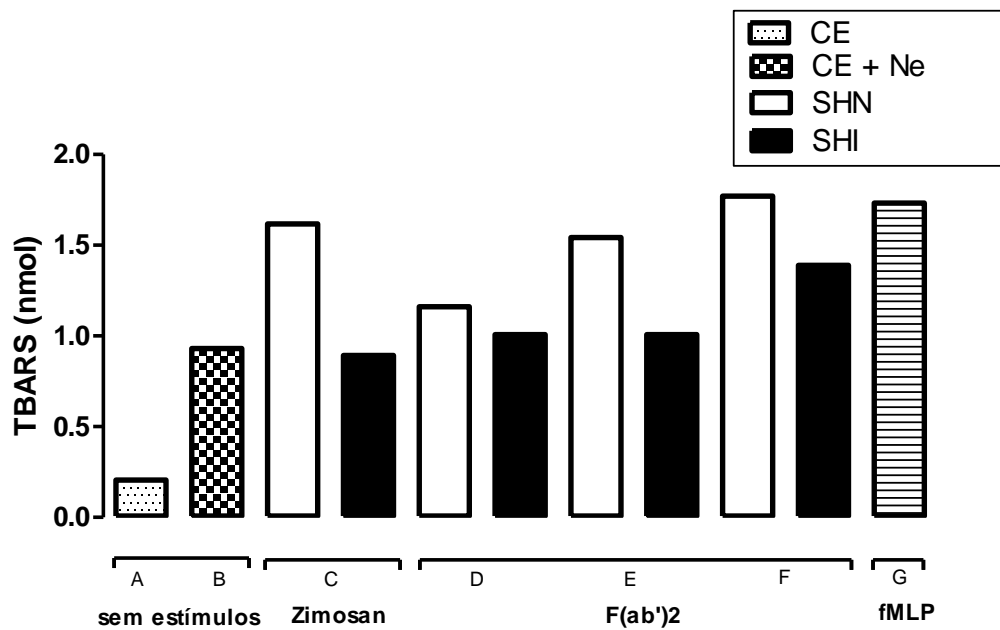


Figura suplementar 2. Quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em células endoteliais. As células endoteliais foram expostas a neutrófilos expressando as variantes 77R ou 77H por 30 minutos à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram lavadas com PBS pH 7.2, acrescidas de tripsina, transferidas para eppendorf contendo meio de cultura e centrifugadas. Ao pélete foi adicionado o reagente de TBARS. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado utilizando a absortividade molar do MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em nM de TBARS. As barras representam a padronização do ensaio. F(ab')<sub>2</sub>, fragmento de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; CE, células endoteliais, Ne, neutrófilo. Os valores dos estímulos foram descontados da respectiva espontânea CE+Ne (B). A, CE; B, CE+Ne; C, Zi 1 mg; D, F(ab')<sub>2</sub> 10 µg; E, F(ab')<sub>2</sub> 20 µg; F, F(ab')<sub>2</sub> 30 µg; G, fMLP 10<sup>-6</sup> M. A concentração de F(ab')<sub>2</sub> escolhida foi a de 20 µg.

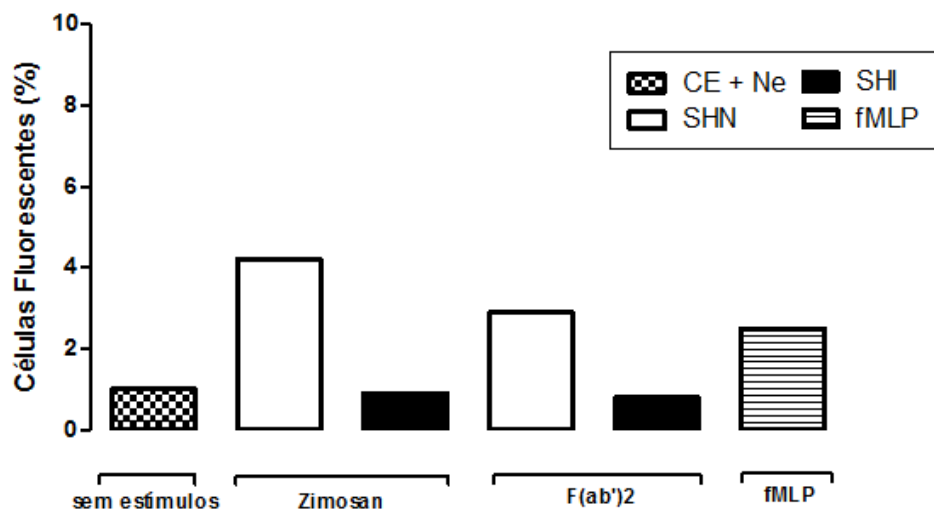


Figura suplementar 3. Quantificação da porcentagem de células fluorescentes marcadas com anti-MPO em placas *transwell*. As células endoteliais foram expostas a neutrófilos expressando as variantes 77R ou 77H por 30 minutos à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram lavadas com PBS pH 7.2, acrescidas de tripsina, transferidas para eppendorf contendo meio de cultura e centrifugadas. Ao pélete foi adicionado a solução de paraformaldeído 1% (para fixar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, o pélete foi tratado com a solução de triton X-100 0,02% (para permeabilizar as células) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. As amostras foram marcadas com anticorpo anti-MPO ou isotipo marcados com FITC e lidas no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem de células fluorescentes. F(ab')<sub>2</sub>, fragmento de ligação do antígeno; fMLP, formil-metil-leucil-fenilalanina; SHN, soro humano normal; SHI, soro humano inativado; CE, células endoteliais, Ne, neutrófilo.



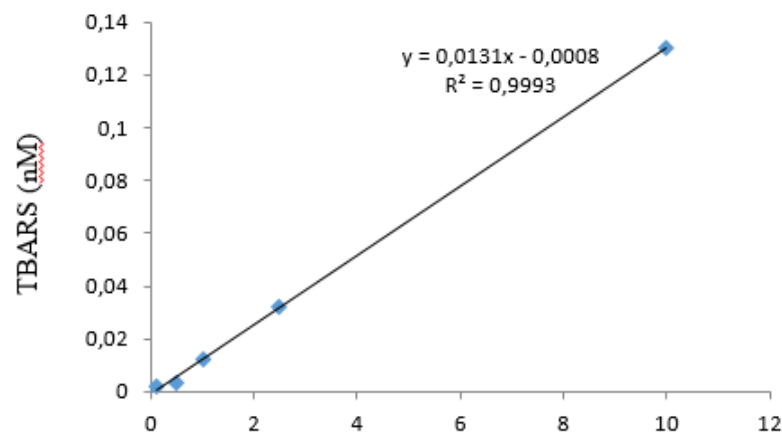


Figura suplementar 4. Curva da concentração de malonaldeído para cálculo da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para células endoteliais. Ao padrão foi adicionado o reagente de TBARS. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado utilizando a absorvidade molar do MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em nM de TBARS. Equação da reta:  $R^2 = 0,9993$ .

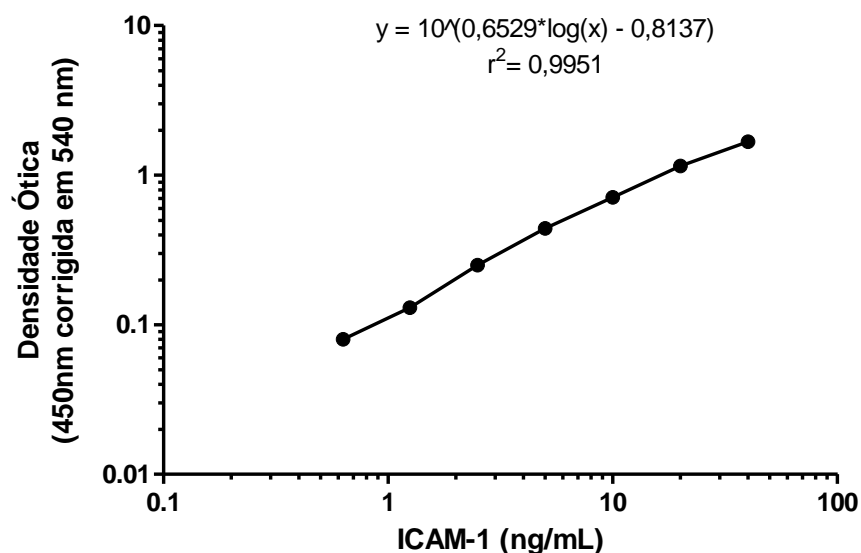


Figura suplementar 5. Curva da concentração de ICAM-1 para cálculo da concentração de ICAM-1 liberado pelas células endoteliais. O padrão foi submetido ao ensaio de ELISA (kit R&D system, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm, com correção a 540 nm. O cálculo da curva foi realizado segundo o fabricante do kit e expressos em ng/mL de ICAM-1. Equação da reta:  $R^2 = 0,9944$ .

## 9.3 Protocolos para o preparo das principais soluções utilizadas

<b>Solução Balanceada de Hanks</b>	
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> Anidro	0,139 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,048 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06 g
Glicose	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g
Água deionizada qsp.	1000 mL
Ajustar pH final para 7,2 a 25°C com NaOH. Filtrar.	

<b>Solução de Gelatina 2,5% em Cloreto de Sódio 0,15 M</b>	
Gelatina	2,5 g
Solução de NaCl 0,15 M qsp.	100 mL
Aquecer o NaCl e juntar a gelatina. Deixar a 37°C.	

<b>Cloreto de Amônio 0,83%</b>		
NH <sub>4</sub> Cl	4,28 g	8,56 g
Água deionizada estéril qsp.	500 mL	1000 mL
Ajustar pH final para 7,2. Filtrar.		

<b>Solução de Alséver</b>	
Citrato trissódico . 2H <sub>2</sub> O	8 g
NaCl	0,4 g
Glicose	0,139 g
Água deionizada qsp.	0,1 g
Ajustar pH final para 6,1 com ácido cítrico 10%. Filtrar.	

<b>Cloreto de Sódio 0,15 M (0,9%)</b>	
NaCl	8,76 g
Água deionizada qsp.	1000 mL
Autoclavar.	

<b>PBS (Salina Tamponada com Fosfato) pH 7,4 (10X)</b>	
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Água deionizada qsp.	1000 mL
Ajustar pH final para 7,4 a 25°C com HCl.	

<b>Tampão de Amostra para DNA (6X)</b>	
40% sacarose	4,0 g
0,25% azul de bromofenol	0,025 mL
Água deionizada qsp.	10 mL
Alíquotas de 1 mL e armazenar em -20°C.	

<b>Líquido de Turk</b>	
Violeta genciana 1%	1 mL
Ácido acético glacial	1 mL
Água deionizada qsp.	100 mL

<b>Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X Concentrado</b>	
Tris base	121,1 g (1 M)
Ácido bórico anidro	55,6 g (0,9 M)
EDTA.Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,7 g (10 mM)
Água deionizada qsp.	1000 mL

<b>Tampão de Lise I</b>	
Tris-HCl	1,57 g
Água deionizada qsp	1000 mL
Acertar o pH para 7,5.	
Sacarose	102,69 g
MgCl <sub>2</sub>	0,048 g
Solubilizar no Tris-HCl preparado previamente.	
Triton X-100	10 mL
Água estéril qsp.	1000mL
Estocar sob refrigeração (4°C) e ao abrigo da luz.	

<b>Tampão de Lise II</b>	
NaCl	4,35 g
EDTA	8,92 g
Água estéril qsp.	1000 mL
Ajustar pH final para 8,0. Estocar à temperatura ambiente.	

<b>Cloreto de Sódio 6 M</b>	
NaCl	34,8 g
Água deionizada qsp.	100 mL
Estocar à temperatura ambiente.	

*Anexos*

## ANEXO A



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



Of. CEP/FCFRP nº. 035/2014  
kms

Ribeirão Preto, 3 de julho de 2014.

À pós-graduanda  
**Nathália Cristina Canicoba**  
Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado  
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "ATIVACÃO IN VITRO DE NEUTRÓFILOS VIA CR3: IMPLICAÇÕES DA VARIANTE DA CADEIA DO CD11B (RS1143679) PARA AS INTERAÇÕES COM O ENDOTÉLIO", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 350, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 132ª Reunião Ordinária realizada em 02/07/2014.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de **emenda** na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

**Prof.ª. Dr.ª. Elisa Maria de Sousa Russo**  
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP



**COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER  
DE RIBEIRÃO PRETO - MATER**

**Ref.: Projeto de Pesquisa: Ativação in vitro de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio.**

**Nº 014/2014**

**Nathália Cristina Canicoba**

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 03/03/2015 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,

  
**DR<sup>a</sup>. ANA MÁRCIA SPANÓ NAKANO**

**Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher**

## ANEXO B

Voluntários saudáveis para obtenção de neutrófilos e DNA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Prezada Senhor(a),

- Você está sendo convidado(a) a participar em uma pesquisa que estuda como os neutrófilos (células de defesa do nosso corpo) combatem e eliminam os micróbios que invadem nosso corpo.
- A sua participação é **voluntária**: você é livre para aceitar participar ou não.
- Para saber sobre a pesquisa, leia as explicações abaixo neste papel.
- Você poderá fazer qualquer pergunta para tirar suas dúvidas sobre a pesquisa.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**Nome da pesquisa:** "Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio."

**Pesquisadores Responsáveis:** Nathália Cristina Canicoba, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado.

**Local:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Av. do Café s/nº - Campus USP, Bloco R, sala 7 - Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP.

#### Por que essa pesquisa está sendo feita?

No sangue existem proteínas e células que trabalham para defender o nosso corpo contra micróbios. Uma dessas células é o neutrófilo. Os neutrófilos possuem uma proteína chamada CR3 que ajuda a destruir os micróbios. Mas como isso acontece? O CR3 ajuda o neutrófilo a liberar substâncias tóxicas sobre o micróbio. Uma destas substâncias é a mieloperoxidase, que irá destruir o micróbio, impedindo que ele cause doença. Mas para quase tudo o que é feito no nosso corpo há uma receita no nosso DNA. Algumas pessoas têm algumas diferenças nas receitas (ou seja, no DNA) e, às vezes, produzem proteínas diferentes que são chamadas de variantes. A proteína CR3 dos neutrófilos tem uma mudança na sua receita, chamada rs1143679. Nesta pesquisa, nós queremos estudar se esta mudança na receita do CR3 pode modificar a capacidade do neutrófilo de liberar a mieloperoxidase para destruir os micróbios.

#### Como será feita a pesquisa?

Nós precisamos de amostras de sangue para estudar os neutrófilos e o DNA.

Para doar sangue para a nossa pesquisa, o participante voluntário, homem ou mulher, deve ter idade entre 18 e 50 anos, não pode ser fumante; não pode ter tomado anti-inflamatório nos últimos 7 dias; não pode estar tomando medicamento controlado, antibiótico e imunossupressor; e para mulheres, não pode estar grávida.

- Se você puder e aceitar participar, você precisa:

- depois de ler e compreender este papel assiná-lo em duas vias (uma para você e outra para os pesquisadores);
- doar sangue uma única vez; você doará 30 mL de sangue (= 3 colheres de sopa rasas).

#### Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que poderão ocorrer são a formação de hematomas e sensação dolorosa no local da picada da agulha, o que normalmente não traz problemas para a pessoa. Para diminuir esse risco o sangue será colhido por uma pessoa experiente.



**O que acontece se eu não aceitar participar?**

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. Sua participação é **voluntária**. Você terá liberdade para desistir a qualquer momento durante a pesquisa. Basta nos avisar pelos telefones, que aparecem no final deste papel.

**Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?**

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Não haverá benefício direto você, mas sua participação irá nos ajudar a estudar os neutrófilos e o CR3, que defendem o nosso corpo contra micróbios.

Afirmamos que o seu nome e de todos os participantes serão guardados em segredo. Somente os resultados, sem os nomes, serão divulgados em revistas científicas. Se desejar, poderá conhecer os resultados da pesquisa, basta pedir aos pesquisadores.

Quando a pesquisa terminar, se houver alguma sobra do seu sangue, ela não será guardada, ela será jogada fora.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones abaixo.

***Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento***

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar como voluntário(a) do estudo descrito acima. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora Nathália Cristina Canicoba sobre a pesquisa, a doação do meu sangue, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Sei que em qualquer momento poderei esclarecer dúvidas, conhecer os resultados e que os nomes dos participantes serão sempre guardados em segredo pelos pesquisadores. Foi-me garantido o direito de retirar meu consentimento a qualquer momento durante a pesquisa, sem que isso leve a qualquer prejuízo para a minha pessoa.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nathália Cristina Canicoba  
Pesquisadora Responsável – CPF 373.646.128-31

**Telefones e e-mails para contato dos Pesquisadores Responsáveis e do Comitê de Ética:**

- Nathália Cristina Canicoba ([nathcristina@uol.com.br](mailto:nathcristina@uol.com.br)): 16-3315-0558 / 16-98121-0795
- Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado ([clenimar@usp.br](mailto:clenimar@usp.br)): 16-3315-0558 / 16-98123-9718
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP: ([cep@fcrp.usp.br](mailto:cep@fcrp.usp.br)) (16) 3315-4213.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### Prezada Senhor(a),

- Você está sendo convidado(a) a participar em uma pesquisa que estuda como os neutrófilos (células de defesa do nosso corpo) combatem e eliminam os micróbios que invadem nosso corpo.
- A sua participação é **voluntária**: você é livre para aceitar participar ou não.
- Para saber sobre a pesquisa, leia as explicações abaixo neste papel.
- Você poderá fazer qualquer pergunta para tirar suas dúvidas sobre a pesquisa.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**Nome da pesquisa:** "Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio."

**Pesquisadores Responsáveis:** Nathália Cristina Canicoba, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado.

**Local:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Av. do Café s/nº - Campus USP, Bloco R, sala 7 - Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP.

### Por que essa pesquisa está sendo feita?

No sangue existem proteínas e células que trabalham para defender o nosso corpo contra micróbios. Uma dessas células é o neutrófilo. Os neutrófilos possuem uma proteína chamada CR3 que ajuda a destruir os micróbios. Mas como isso acontece? O CR3 ajuda o neutrófilo a liberar substâncias tóxicas sobre o micróbio. Uma destas substâncias é a mieloperoxidase, que irá destruir o micróbio, impedindo que ele cause doença. Mas para quase tudo o que é feito no nosso corpo há uma receita no nosso DNA. Algumas pessoas têm algumas diferenças nas receitas (ou seja, no DNA) e, às vezes, produzem proteínas diferentes que são chamadas de variantes. A proteína CR3 dos neutrófilos tem uma mudança na sua receita, chamada rs1143679. Nesta pesquisa, nós queremos estudar se esta mudança na receita do CR3 pode modificar a capacidade do neutrófilo de liberar a mieloperoxidase para destruir os micróbios.

### Como será feita a pesquisa?

Nós precisamos de amostras do seu sangue para usar a parte líquida dele, o soro, que contém proteínas necessárias para o nosso estudo.

Para doar sangue para a nossa pesquisa, o participante voluntário, homem ou mulher, deve ter idade entre 18 e 35 anos, não pode ser fumante; não pode ter tomado anti-inflamatório nos últimos 7 dias; não pode estar tomando medicamento controlado, antibiótico e imunossupressor; e para mulheres, não pode estar grávida, nem estar fazendo uso de anticoncepcional: pílula, injetável, adesivo na pele ou dentro do útero.

- Se você puder e aceitar participar, você precisa:

- depois de ler e compreender este papel assiná-lo em duas vias (uma para você e outra para os pesquisadores);
- doar sangue uma única vez; você doará 20 mL de sangue (= 2 colheres de sopa rasas).

### Quais são os riscos que podem ocorrer?

Os riscos que poderão ocorrer são a formação de hematomas e sensação dolorosa no local da picada da agulha, o que normalmente não traz problemas para a pessoa. Para diminuir esse risco o sangue será colhido por uma pessoa experiente.

**O que acontece se eu não aceitar participar?**

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. Sua participação é voluntária. Contudo, após doar o seu sangue não será possível desistir de participar da pesquisa, porque o seu sangue será misturado ao sangue dos outros doadores, e esta mistura será usada como um reagente para a pesquisa, sem identificar o nome do doador.

**Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?**

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Não haverá benefício direto para você, mas sua participação irá nos ajudar a estudar os neutrófilos e o CR3, que defendem o nosso corpo contra micróbios.

Afirmamos que o seu nome e de todos os participantes serão guardados em segredo. Somente os resultados, sem os nomes, serão divulgados em revistas científicas. Se desejar, poderá conhecer os resultados da pesquisa, basta pedir aos pesquisadores.

Quando a pesquisa terminar, se houver alguma sobra do seu sangue, ela não será guardada, ela será jogada fora.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones abaixo.

***Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento***

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar como voluntário(a) do estudo descrito acima. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora Nathália Cristina Canicoba sobre a pesquisa, a doação do meu sangue, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Sei que em qualquer momento poderei esclarecer dúvidas, conhecer os resultados e que os nomes dos participantes serão sempre guardados em segredo pelos pesquisadores. Foi-me explicado também o motivo pelo qual não posso retirar meu consentimento após meu sangue ter sido colhido.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nathália Cristina Canicoba  
Pesquisadora Responsável – CPF 373.646.128-31

**Telefones e e-mails para contato dos Pesquisadores Responsáveis e do Comitê de Ética:**

- Nathália Cristina Canicoba ([nathcristina@uol.com.br](mailto:nathcristina@uol.com.br)): 16-3315-0558 / 16-98121-0795
- Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado ([clenimar@usp.br](mailto:clenimar@usp.br)): 16-3315-0558 / 16-98123-9718
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP: ([cep@fcrp.usp.br](mailto:cep@fcrp.usp.br)) (16) 3315-4213.

Voluntárias saudáveis para obtenção de células endoteliais  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Prezada Senhora,**

- Você está sendo convidada a participar em uma pesquisa que estuda como os neutrófilos (células de defesa do nosso corpo) combatem e eliminam os micróbios que invadem nosso corpo.
- A sua participação é **voluntária**: você é livre para aceitar participar ou não.
- Para saber sobre a pesquisa, leia as explicações abaixo neste papel.
- Você poderá fazer qualquer pergunta para tirar suas dúvidas sobre a pesquisa.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

**Nome da pesquisa:** "Ativação *in vitro* de neutrófilos via CR3: implicações da variante da cadeia do CD11b (rs1143679) para as interações com o endotélio."

**Pesquisadores Responsáveis:** Nathália Cristina Canicoba, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado.

**Local:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Av. do Café s/nº - Campus USP, Bloco R, sala 7 - Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP.

**Por que essa pesquisa está sendo feita?**

No sangue existem proteínas e células que trabalham para defender o nosso corpo contra micróbios. Uma dessas células é o neutrófilo. Os neutrófilos possuem uma proteína chamada CR3 que ajuda a destruir os micróbios. Mas como isso acontece? O CR3 ajuda o neutrófilo a liberar substâncias tóxicas sobre o micróbio. Uma destas substâncias é a mieloperoxidase, que irá destruir o micróbio, impedindo que ele cause doença. Mas para quase tudo o que é feito no nosso corpo há uma receita no nosso DNA. Algumas pessoas têm algumas diferenças nas receitas (ou seja, no DNA) e, às vezes, produzem proteínas diferentes que são chamadas de variantes. A proteína CR3 dos neutrófilos tem uma mudança na sua receita, chamada rs1143679. Nesta pesquisa, nós queremos estudar se esta mudança na receita do CR3 pode modificar a capacidade do neutrófilo de liberar a mieloperoxidase para destruir os micróbios.

**Como será feita a pesquisa?**

Nós precisamos de um pedaço do cordão umbilical para estudar o contato entre as células desse cordão com os neutrófilos.

Para doar o cordão umbilical para a nossa pesquisa, a participante voluntária, deve ter idade entre 18 e 40 anos; não pode ser fumante e não pode estar tomando medicamento controlado, antibiótico e/ou imunossupressor.

- Se você puder e aceitar participar, você precisa:

- depois de ler e compreender este papel assiná-lo em duas vias (uma para você e outra para os pesquisadores);
- após o parto, o cordão umbilical será usado pelo hospital para a realização de exames. Quando terminarem os exames, o cordão será jogado fora. Se você aceitar participar da pesquisa, você irá autorizar a doação do cordão umbilical no momento em que o hospital irá jogá-lo fora. Assim, esse cordão, ao invés de ser jogado fora, será levado para o laboratório para obtenção das células.

**Quais são os riscos que podem ocorrer?**

A doação do cordão umbilical para a pesquisa não apresenta riscos previsíveis, uma vez que o cordão será doado somente no momento de ser jogado fora.

**O que acontece se eu não aceitar participar?**

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para você. O seu atendimento na maternidade será o mesmo. Sua participação é **voluntária**. Você tem toda a liberdade de decidir se quer ou não doar o cordão umbilical para a pesquisa. Se concordar em participar, você também terá a liberdade para desistir a qualquer momento durante a pesquisa. Basta nos avisar pelos telefones, que aparecem no final deste papel. Caso você queira desistir de participar, as células retiradas do seu cordão umbilical serão jogadas fora e os resultados dos testes realizados com ele não entrarão mais na pesquisa.

**Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?**

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Não haverá benefício direto para você, mas sua participação irá nos ajudar a estudar os neutrófilos e o CR3, que defendem o nosso corpo contra micróbios.

Afirmamos que o seu nome e de todas as participantes serão guardados em segredo. Somente os resultados, sem os nomes, serão divulgados em revistas científicas. Se desejar, poderá conhecer os resultados da pesquisa, basta pedir aos pesquisadores.

Quando a pesquisa terminar, se houver alguma sobra de células, ela não será guardada, ela será jogada fora.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones abaixo.

***Favor ler e preencher abaixo, se for do seu consentimento***

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar como voluntária do estudo descrito acima. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora Nathália Cristina Canicoba sobre a pesquisa, a doação do meu cordão umbilical, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Sei que em qualquer momento poderei esclarecer dúvidas, conhecer os resultados e que os nomes das participantes serão sempre guardados em segredo pelos pesquisadores. Foi-me garantido o direito de retirar meu consentimento a qualquer momento durante a pesquisa, sem que isso leve a qualquer prejuízo para a minha pessoa.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nathália Cristina Canicoba  
Pesquisadora Responsável – CPF 373.646.128-31

**Telefones e e-mails para contato dos Pesquisadores Responsáveis e do Comitê de Ética:**

- Nathália Cristina Canicoba ([nathcristina@uol.com.br](mailto:nathcristina@uol.com.br)): 16-3315-0558 / 16-98121-0795
- Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado ([clenimar@usp.br](mailto:clenimar@usp.br)): 16-3315-0558 / 16-98123-9718
- Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP: ([cep@fcrp.usp.br](mailto:cep@fcrp.usp.br)) (16) 3315-4213.

