



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes**

**Amanda Maria da Silva Santos**

**Estudo do efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos *in vivo* e *in vitro***

**Rio de Janeiro**

**2024**

Amanda Maria da Silva Santos

**Estudo do efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos *in vivo* e *in vitro***

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

Orientadora: Dra. Elaine Cruz Rosas

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Muller Henriques

Rio de Janeiro

2024

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

S237

Santos, Amanda Maria da Silva.

Estudo do efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos in vivo e in vitro / Amanda Maria da Silva Santos. - 2024.

90 f.

Orientadora: Dra. Elaine Cruz Rosas

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Muller Henriques

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

1. Neutrófilos - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Quimiotaxia. I. Rosas, Elaine Cruz. II. Henriques, Maria das Graças Muller. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 530.145

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Amanda Maria da Silva Santos

**Estudo do efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos *in vivo* e *in vitro***

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

Aprovada em 25 de março de 2024.

Orientadora: Dra. Elaine Cruz Rosas  
Fundação Oswaldo Cruz

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria das Graças Muller Henriques  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Alfredo de Moraes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Janylle Nunes de Souza Ferro  
Universidade Federal de Alagoas

Rio de Janeiro

2024

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus avós Nair Ribeiro e José Verissimo dos Santos (*in memoriam*), a minha mãe, aos meus filhos e ao meu namorado, que em todos os momentos se fizeram presentes me dando força e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade amiga por se fazerem presentes em cada hora desses dois anos de mestrado, por terem me orientado, guiado e fortalecido em cada desafio.

Aos voluntários que com tanto carinho, empenho e afincos se disponibilizaram a doar suas células para a condução desse estudo. Obrigada por tanto!

À minha orientadora e coorientadora, Dra Elaine Cruz Rosas e Dra Maria das Graças Henriques pela oportunidade e orientação.

Ao Dr Leonardo Noburo Seito e à Dra Luana Barbosa Correa do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelos inúmeros ensinamentos e ajuda com os experimentos.

À Dra Tatiana Almeida Pádua do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelo auxílio nos experimentos de pleurisia com LPS e ensaios de apoptose.

Ao Dr Thadeu Costa do Laboratório de Farmacologia Aplicada pelo auxílio no experimento de pleurisia com LPS.

Ao Dr André Luiz Franco Sampaio e seu aluno Gustavo Werneck de Souza e Silva do Laboratório de Farmacologia Molecular pela ajuda com os experimentos de dosagem das Espécies reativas do oxigênio.

À toda equipe do laboratório que também fizeram parte desse trabalho: Érika Cunha, Márcia Rami, Aryella Mariah Couto Correa e Patrícia Silva Carvalho.

À equipe do biotério, Suelen de Oliveira Barreto, Alan Fernandes da Paz e Ubirajara Albertin Ribeiro, pelo cuidado com os camundongos e ensinamentos.

Ao Dr Fredson Costa Serejo pela amizade, pelo ensinamento e oportunidade durante o estágio docente e por sempre me contagiar com sua dedicação e paixão à biomedicina.

Aos meus avós (*in memoriam*) Nair Ribeiro e José Verissimo dos Santos pelo cuidado e por se fazerem presentes mesmo após o desencarne.

À minha querida mãe, Tania Lucia da Silva, por proporcionar condições para que eu pudesse alcançar meus objetivos e sonhos apoiando e incentivando meu trabalho.

Ao Junior Flávio dos Santos, meu amado namorado, simplesmente por tudo. Obrigada por dividir a vida comigo, ser o meu maior incentivador, cuidar de mim nos dias que eu nem mesmo conseguia e por me dar forças.

Aos meus filhos amados Frederico e Ralph por todo apoio emocional. Vocês são a minha maior motivação.

Aos meus amados amigos pelo apoio, incentivo e conversas científicas. Vocês fizeram a diferença nessa trajetória.

Ao Dr Carlos Fernando Araujo Lima por revisar o presente trabalho com tanto empenho, dedicação e carinho.

À banca avaliadora por se disponibilizar a contribuir com o presente trabalho.

Ao programa de Biociências da Universidade Estadual do Rio de Janeiro por toda assistência prestada.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERJ, CAPES e FIOCRUZ pelo auxílio financeiro.

Ele fortalece o cansado e dá grande vigor ao que está sem forças. Até os jovens se cansam e ficam exaustos, e os moços tropeçam e caem, mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.

*Isaías 20: 29-31*

## RESUMO

SANTOS, Amanda Maria da Silva. **Estudo do efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos *in vivo* e *in vitro***. 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Os neutrófilos são células polimorfonucleares de origem mieloide de extrema importância para a efetividade da imunidade inata. São os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea e no tecido inflamado produzem espécies reativas do oxigênio (EROs), armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) e grânulos ricos em enzimas, podendo ser pró-inflamatório ou pró-resolutivo. Neste contexto, abordagens que regulam o acúmulo e a atividade dessas células são relevantes. O galato de metila (GM), um derivado do ácido fenólico encontrado em espécies vegetais apresenta atividade anti-inflamatória. Com isso, este estudo avaliou o efeito do galato de metila na atividade de neutrófilos humanos *in vitro* e na inflamação em modelo animal. Foi realizada a análise de neutrófilos humanos quanto migração e a quimiotaxia, na liberação de EROs e de redes extracelulares, e no processo de apoptose. Também foi avaliada a expressão da molécula de adesão CD11b e o acúmulo de leucócitos circulantes na cavidade torácica de camundongos após a indução da pleurisia com LPS. Nos resultados foi observado que *in vitro* o GM inibiu a migração e a quimiotaxia de neutrófilos estimulados com IL-8 e fMLP, assim como inibiu a polimerização dos filamentos de actina em neutrófilos estimulados com IL-8. O GM reduziu a produção de EROs em neutrófilos estimulados com PMA e LPS, e reduziu de forma dose-dependente a liberação de redes extracelulares de neutrófilos estimulados com PMA. Na pleurisia induzida por LPS foi possível observar que o pré-tratamento com GM inibiu o acúmulo de neutrófilos para a cavidade torácica, assim como reduziu neutrófilos circulantes e a expressão da molécula de adesão CD11b. Podemos concluir com o presente estudo que o GM modula a atividade de neutrófilos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Palavras chaves: neutrófilos; galato de metila; inflamação.

## ABSTRACT

SANTOS, Amanda Maria da Silva. **Study of the effect of methyl gallate on neutrophil activity *in vivo* and *in vitro***. 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Neutrophils are polymorphonuclear cells of myeloid origin that are extremely important for the effectiveness of innate immunity. They are the most abundant leukocytes in the blood circulation and, in inflamed tissue, produce reactive oxygen species (ROS), neutrophil extracellular traps (NETs), and granules rich in enzymes, which can be either pro-inflammatory or pro-resolving. In this context, approaches that regulate the accumulation and activity of these cells are relevant. Methyl gallate (MG), a phenolic acid derivative found in plant species, has anti-inflammatory activity. Therefore, this study evaluated the effect of methyl gallate on human neutrophil activity *in vitro* and on inflammation in an animal model. Human neutrophils were analyzed regarding migration and chemotaxis, the release of ROS and extracellular traps, and the process of apoptosis. The expression of the adhesion molecule CD11b and the accumulation of circulating leukocytes in the thoracic cavity of mice after induction of pleurisy with LPS were also evaluated. Our results showed that MG inhibited migration and chemotaxis in neutrophils stimulated with IL-8 and fMLP, as well as inhibiting the polymerization of actin filaments in neutrophils stimulated with IL-8. MG reduced ROS production in neutrophils stimulated with PMA and LPS and dose-dependently reduced the release of extracellular traps from neutrophils stimulated with PMA. In LPS-induced pleurisy, pre-treatment with MG inhibited the accumulation of neutrophils in the thoracic cavity, as well as reducing circulating neutrophils and the expression of the adhesion molecule CD11b. We conclude from this study that MG modulates neutrophil activity both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: neutrophils; methyl gallate; inflammation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sequência esquemática da migração de neutrófilos.....	24
Figura 2 –	Ilustração resumida da liberação de NETs.....	27
Figura 3 –	Esquema representativo das vias intrínseca e extrínseca da apoptose	30
Figura 4 –	Estrutura química da substância galato de metila.....	33
Figura 5 –	Formação de halos contendo células Polimorfonucleares (PMN) e Mononucleares (MN) utilizando o meio Polymorphprep™ .....	38
Figura 6 –	Campo representativo do Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico no aumento de 40x em lâmina corada em Panótico Rápido.....	39
Figura 7 –	Câmara de Boyden.....	41
Figura 8 –	Avaliação do efeito do galato de metila sob a viabilidade de neutrófilos humanos.....	48
Figura 9 –	Efeito do galato de metila na quimiotaxia de neutrófilos humanos estimulados por IL8.....	49
Figura 10 –	Efeito do galato na quimiotaxia de neutrófilos humanos estimulados por fMLP.....	50
Figura 11 –	Efeito do galato de metila na polimerização da actina em neutrófilos humanos estimulados por IL8 durante o processo de migração.....	51
Figura 12 -	Efeito do galato de metila na produção de Espécies reativas do oxigênio (EROS) por neutrófilos humanos estimulados por IL-8 em 1 hora.....	53
Figura 13 -	Efeito do galato de metila na produção de Espécies reativas do oxigênio (EROS) por neutrófilos humanos estimulados por PMA em 1 hora.....	54
Figura 14 -	Efeito do galato de metila na liberação de Espécies reativas do oxigênio (EROS) por neutrófilos humanos estimulados por LPS em 1 hora.....	55
Figura 15 -	Efeito do galato de metila na liberação de DNA por neutrófilos humanos estimulados por PMA em 4 horas.....	56
Figura 16 -	Efeito do galato de metila na liberação DNA por neutrófilos humanos estimulados por IL-8 nos tempos de 4 e 5.....	56

Figura 17 -	Avaliação do galato de metila sob a apoptose de neutrófilos não estimulados e estimulados com LPS via Anexina V/PI.....	57
Figura 18 -	Avaliação da apoptose em neutrófilos previamente incubados com galato de metila e não estimulados.....	59
Figura 19 -	Avaliação do galato de metila sob a apoptose de neutrófilos estimulados com LPS.....	61
Figura 20 -	Efeito do pré-tratamento com o galato de metila na contagem de leucócitos murinos do lavado pleural.....	63
Figura 21 -	Efeito do pré-tratamento com o galato de metila na contagem de leucócitos periféricos murinos.....	64
Figura 22 -	Efeito do pré-tratamento com o galato de metila na expressão de CD11b em neutrófilos murinos.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE	Anti-inflamatório esteroidal
AIM2	Receptor Ausente no Melanoma 2 (do inglês, <i>Absent in Melanoma 2</i> )
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
AKT/mTOR	Proteína Cinase B (do inglês, <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> )
ANOVA	Análise de Variância
APAF	Fator ativador de protease de apoptose (do inglês, <i>Apoptotic protease activating factor</i> )
AR	Artrite Reumatoide
ATP	Adenosina trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLR	Receptor de Lectina do tipo C
COX	Ciclooxigenase
CR3	(do inglês, <i>complement receptor 3</i> )
CXCL	Ligante de quimiocinas CXC
CXCR	Receptor de quimiocinas
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (do inglês, <i>Damage Associated Molecular Patterns</i> )
DHR	Dihidroxirodamina
DISC	Complexo indutor de morte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECAM	Molécula de adesão celular epiteliais
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinases reguladas por sinal extracelulares
EROs	Espécies reativas do oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> )
F-actina	Filamentos de actina

fMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
FPR	Receptor do peptídeo formil
FS	Fosfatitilserina
G-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos (do inglês, <i>Granulocyte-colony Stimulating Fator</i> )
GM	Galato de Metila
GPCRs	Receptor acoplado a proteína G (do inglês, <i>G protein-coupled receptor</i> )
HMGB1	Proteína B1 do grupo de alta mobilidade (do inglês, <i>High Mobility Group Box 1</i> )
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
IRAK1	Receptor IL-1 associado a quinase (do inglês, <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i> )
i.t	Intratorácico
JAM	Molécula de adesão juncional
LDH	Lactato desidrogenase
LFA 1	(do inglês, <i>leukocyte function-associated antigen-1</i> )
LOX	Lipooxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MAMPs	Padrões moleculares associados à microbiota comensal (do inglês, <i>Microbe Associated Molecular Pattern</i> )
MAPK	(do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
MPO	Mieloperoxidase

NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotina adenina reduzido (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NADPH oxidase	Oxidase de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i> )
NE	Elastase neutrofílica (do inglês, <i>Neutrophil elastase</i> )
NETs	Redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> )
NF- κB	fator de transcrição nuclear κB (do inglês, <i>Nuclear Factor kappa-B</i> )
NLRs	Receptores do tipo NOD (do inglês, <i>NOD-like Receptors</i> )
NOS	Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeos
NOX	NADPH oxidase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAD4	Peptidilarginina deiminase 4 (do inglês, <i>Peptidylarginine deiminase 4</i> )
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PBS	Solução Salina Tamponada com fosfato
PECAM	(do inglês <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
PG	Prostaglandina
PK	Proteína quinase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PL	Fosfolipase (do inglês, <i>Phospholipase</i> )
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato (do inglês, <i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i> )
PMNs	Leucócitos Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
RAGEs	Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada

RPMI 1640	Medium Meio de cultura celular com aplicabilidade em diferentes tipos celulares (do inglês, <i>Roswell Park Memorial</i> )
SBF	Soro Bovino Fetal F2442 (Sigma Aldrich©)
SR	Receptor scavenger
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i> (do inglês, <i>Toll-like Receptors</i> )
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês, TNF related apoptosis inducing ligand)
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
v.o	Via oral

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\mu\text{m}$	Micrômetros
$\kappa$	Kappa
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$\cdot\text{O}_2^-$	Ânion superóxido
$\text{Fe}^{2+}$	Cátion ferroso
$\text{K}^+$	Potássio
mL	Mililitros
$\text{TM}$	Marca registrada (do inglês, <i>Trademark</i> )
HCl	Ácido clorídrico
U/mL	Unidade por mililitros
RCF	Força Centrífuga Relativa (do inglês, <i>Relative Centrifugal Force</i> )
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\mu\text{L}$	Microlitros
mM	Milimolar
mg	Miligramas
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
N	Newton
nm	Nanômetros
ng/mL	Nanograma por Mililitros
mg/Kg	Miligrama por Kilograma
$\mu\text{g}$	Micrograma
mm	Milímetros
nM	Nanomolar
<	Menor
$\text{Ca}^{2+}$	Íon de cálcio

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	34
1.1 <b>Objetivo geral</b> .....	34
1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	34
<b>2 MÉTODOS</b> .....	35
2.1 <b>Declarações de ética</b> .....	35
2.1.1 <u>Experimentação com neutrófilos humano</u> .....	35
2.1.2 <u>Experimentação com animais</u> .....	35
2.2 <b>Seleção dos voluntários</b> .....	35
2.2.1 <u>Critérios de inclusão</u> .....	36
2.2.2 <u>Critérios de exclusão</u> .....	36
2.3 <b>Anticorpos e reagentes</b> .....	36
2.4 <b>Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico</b> .....	37
2.5 <b>Avaliação da pureza da amostra</b> .....	38
2.6 <b>Galato de metila e Pré-tratamento</b> .....	39
2.7 <b>Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos humanos</b> .....	39
2.8 <b>Ensaio de Quimiotaxia em Câmara de Boyden</b> .....	40
2.9 <b>Ensaio de Polimerização de actina em Microscopia de Fluorescência</b> .....	41
2.10 <b>Ensaio de EROs em Citometria de fluxo</b> .....	42
2.11 <b>Quantificação de liberação de DNA</b> .....	43
2.12 <b>Ensaio de Apoptose em Citometria de fluxo</b> .....	43
2.13 <b>Animais</b> .....	44
2.14 <b>Pleurisia induzida por LPS</b> .....	44
2.14.1 <u>Lavagem da cavidade pleural</u> .....	45
2.15 <b>Contagem de leucócitos do lavado pleural</b> .....	45
2.15.1 <u>Contagem total de leucócitos</u> .....	45
2.15.2 <u>Contagem diferencial de leucócitos</u> .....	45
2.16 <b>Contagem de leucócitos de sangue periférico</b> .....	46
2.16.1 <u>Contagem total de leucócitos</u> .....	46
2.16.2 <u>Contagem diferencial de leucócitos</u> .....	46

2.17 Moléculas de adesão.....	46
2.18 Análise Estatística.....	47
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 Efeito do galato de metila na viabilidade de neutrófilos.....	48
3.2 Efeito do galato de metila na migração de neutrófilos .....	49
3.3 Efeito do galato de metila na polimerização da actina em neutrófilos .....	50
3.4 Efeito do galato de metila na produção de EROs por neutrófilos humanos	52
3.5 Efeito do galato de metila na liberação de DNA por neutrófilos humanos ..	55
3.6 Efeito do galato de metila na apoptose de neutrófilos humanos .....	57
3.7 Efeito do pré-tratamento com galato de metila na migração de leucócitos durante a pleurisia induzida por LPS .....	62
3.8 Efeito do pré-tratamento com Galato de Metila na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos no modelo de pleurisia induzida por LPS .....	65
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO A - Comparação de liberação de NETs entre voluntário do sexo masculino e feminino.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

### Inflamação

O processo inflamatório é uma resposta dos tecidos vascularizados desencadeada por estímulos físicos, químicos ou infecciosos que causam alterações celulares e moleculares no local afetado (MEDZHITOV, 2008; SCHUTT; SIEGEL, 2023). Em alguns casos a inflamação ocorre como uma resposta adaptativa ao mau funcionamento de tecidos levando a um desequilíbrio homeostático, processo que ocasiona diversas doenças como: artrite reumatoide (AR), lúpus, asma e câncer (FREIRE; VAN DYKE, 2013; SCHUTT; SIEGEL, 2023).

A inflamação é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, diminuição do fluxo sanguíneo próximo ao sítio inflamatório e recrutamento de leucócitos. Esses eventos levam aos cinco sinais cardinais da inflamação: dor, rubor, calor, inchaço e perda da função. Embora, os eventos vasculares e celulares ocorram de forma progressiva e síncrona, a inflamação é didaticamente dividida em aguda ou crônica (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022).

A inflamação aguda é marcada pela vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e pela migração de células. Após a cessação ou eliminação da causa da inflamação, o restabelecimento da homeostase tecidual inicia a fase de resolução (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022). No entanto, se a resolução da inflamação não ocorrer adequadamente uma resposta inflamatória crônica pode se estabelecer através da instauração de um processo inflamatório constante, marcado por necrose tecidual, proliferação dos vasos sanguíneos e fibrose, que podem levar ao dano e/ou disfunção tecidual (MEDZHITOV, 2010; ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

## Neutrófilos

Os neutrófilos são células polimorfonucleares (PMNs) de origem mieloide produzidas através da indução do fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF) (LIESCHKE *et al.*, 1994). São considerados fagócitos da família dos granulócitos e de extrema importância para efetividade da imunidade Inata (NÉMETH; SPERANDIO; MOSCSAI, 2020). A produção é regulada pela taxa de proliferação e diferenciação dos precursores mieloides na medula óssea, sofrendo alterações durante processos infecciosos e inflamatórios (COWLAND; BORREGAARD, 2016).

Paul Erlich, em 1880, descobriu o neutrófilo ao identificar os núcleos multilobulados e a presença de grânulos citoplasmáticos por meio de técnicas de fixação e coloração de células sanguíneas (KAUFMANN, 2008). A coloração dos grânulos só foi possível com corantes neutros, o que conferiu o nome à célula (HIDALGO; CASANOVA-ACEBES, 2021; KAUFMANN, 2008). Anos depois, entre 1883 e 1884, Elie Metchnikoff descreveu algumas das funções efetoras dos neutrófilos ao observar o recrutamento dessas células para o local da lesão, onde promoviam a digestão do corpo estranho (KAUFMANN, 2008; METCHNIKOFF, 1983).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea humana, representando aproximadamente 50-60% dos leucócitos totais, e possuem o tempo de meia vida extremamente curto, podendo permanecer cerca de 6 a 8 horas no sangue circulante e aproximadamente entre 1 e 4 dias nos tecidos (ATHENS *et al.*, 1961; MANTOVANI *et al.*, 2011).

Possuem morfologia esférica com diâmetro entre 10 a 12  $\mu\text{m}$ , núcleo segmentado apresentando de 3 a 5 lóbulos conectados entre si, justificando a nomenclatura polimorfonuclear, a presença de três tipos diferentes de grânulos em seu citoplasma, classificados de acordo com seu grau de importância, afinidade com o corante azul A, tamanho, morfologia e pela presença de mieloperoxidase (MPO), sendo eles: primários ou azurófilos, secundários ou específicos e terciários ou gelatinase, e vesículas secretoras (BORREGAARD, 2010; DOROSZ *et al.*, 2020; RAMOJI *et al.*, 2012).

Entre os leucócitos envolvidos no processo inflamatório os neutrófilos são os primeiros a chegar ao tecido inflamado e são cruciais para resolução da inflamação (SINGHAL; KUMAR, 2021). São células com a capacidade de fagocitar células

necróticas e/ou micro-organismos impedindo a amplificação da resposta imunológica, liberam mediadores inflamatórios e produzem proteínas importantes para restauração da homeostasia (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014. SINGHAL; KUMAR, 2021).

Em processos inflamatórios crônicos são considerados amplificadores da inflamação, por serem continuamente recrutados para o sítio inflamado, contribuindo para aumento do dano tecidual através de seus mecanismos efetores (MUTUA; GERSHWIN, 2021). Esses mecanismos podem ser a produção de mediadores inflamatórios que, dentre muitas funções, ativam outras células do sistema imunológico e a liberação de seus grânulos citoplasmáticos ricos em enzimas e de redes extracelulares de neutrófilo (NETs) (MUTUA; GERSHWIN, 2021; PEISELER; KUBES, 2019).

Neste sentido, em diferentes doenças hepáticas crônicas foi demonstrado que os neutrófilos desempenham também um papel diferente do esperado, levando a lesão tecidual, a imunossupressão, e a promoção de metástase tumoral sob um microambiente específico, demonstrando que a função dessas células pode ser protetora ou deletéria (LIU; WANG; XU, 2021). Na AR os neutrófilos são os leucócitos em maior concentração na cavidade articular e desempenham uma função pró-inflamatória orquestrando a inflamação (MANTOVANI *et al.*, 2011).

## **Sinalização celular**

Os neutrófilos alcançam o tecido inflamado através da sinalização celular, uma vez que os receptores intracelulares e extracelulares são capazes de reconhecer antígenos e transmitir sinais importantes para a defesa do organismo (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022).

No tecido a resposta inflamatória pode ser desencadeada pelos componentes da imunidade inata por três formas diferentes, uma exógena e duas endógenas: pelo reconhecimento de estruturas moleculares dos microrganismos denominada padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelo desequilíbrio das bactérias da microbiota provocado por estresse denominado padrões moleculares associados à microbiota comensal (MAMPs), e pela produção ou liberação de moléculas endógenas por células danificadas denominado padrões moleculares associados a danos

(DAMPs) (PATIDAR *et al.*, 2018). A inflamação então se estabelece quando há o reconhecimento dessas estruturas pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) de células imunocompetentes residentes, esse reconhecimento ativam os leucócitos os tornando efetores estimulando a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (FLESHNER, 2013; PATIDAR *et al.*, 2018).

Os DAMPs são moléculas intracelulares derivadas do hospedeiro como Adenosina Trifosfato (ATP), proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), moléculas alteradas estrutural ou proteoliticamente, como ácido hialurônico ou colágeno liberadas no meio extracelular por células necróticas e de matriz extracelular que causam ativação do sistema imune desencadeando um processo inflamatório (ZINDEL; KUBES, 2019). Essas moléculas são reconhecidas por PRRs como os Receptores do tipo Toll (TLRs), que se encontram na membrana plasmática e endossômicas de células apresentadoras de antígeno, os Receptores do tipo NOD (NLRs) nos quais se destacam o Receptor de Domínios de Oligonização e Nucleotídeos (NOS), o Receptor Ausente no Melanoma 2 (AIM2), o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGEs), Receptor de Lectina do tipo C (CLR), Receptor scavenger (SR) e Receptor acoplado a proteína G (GPCRs) como Receptor 1 de formil-peptídeo (FPR1) (REES *et al.*, 2016; ZINDEL; KUBES, 2019).

Os PRRs são moléculas presentes nas superfícies de diferentes células, contudo, expressos em maior variedade e quantidade em macrófagos e neutrófilos (ZINDEL; KUBES, 2019). Essas moléculas desencadeiam cascatas de sinalização que envolvem a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), a fosfaridilinositol--3-quinase (PI3K) e o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que levam a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (MCCORMICK; CHU; VERMEREN, 2017; ZINDEL; KUBES, 2019)

No tecido lesionado células residentes como macrófagos detectam DAMPs e/ou PAMPs e recrutam os neutrófilos circulantes para o local da lesão através da ativação das vias GPCRs, TLRs e NLRs (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022). Dentre estes receptores, os TLRs desempenham um papel crucial no início da resposta inflamatórias. Estes são glicoproteínas de superfície constituídos por onze tipos de proteínas descritas em humanos, estão presentes na membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) ou endossômica (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) e possuem um domínio intracelular denominado domínio TIR que possibilita a

dimerização do receptor e ativa as vias de sinalização (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A interação de padrões moleculares do antígeno com TLRs favorece o deslocamento e a chegada de neutrófilos ao sítio inflamado, NFκB ou MAPK são vias de sinalização que levam a ativação dos neutrófilos através de transdução de sinal dessa interação. Uma vez que esses receptores influenciam diretamente na quimiotaxia dessas células, as vias de sinalização são ativadas e provocam a expressão de L-selectina, aumento na produção de citocinas, regulação positiva de integrinas e posterga o processo de apoptose (HAYASHI; MEANS; LUSTER, 2003; HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022).

### **Ativação e migração de neutrófilos**

O processo de ativação dos neutrófilos pode ocorrer de diferentes formas. A IL-8 ativa os neutrófilos ao se ligar a receptores de quimiocinas específicos conhecidos como CXCR1 e CXCR2 que estão presentes na superfície dos neutrófilos. A ligação da IL-8 a esses receptores também leva a mobilização dos neutrófilos. Já o fMLP promove a ativação dos neutrófilos ao se ligar aos receptores de formil-peptídeo (FPRs), em específico aos FPR1 e FPR2. Os receptores CXCR1/2 e FPR1/2 estão acoplados a proteína G e a interação com os seus ligantes ativa as vias de sinalização da fosfolipase C (PLC), PK13 e MAPK (PETRI; SANZ, 2018).

O recrutamento de neutrófilos é uma fase importante no desenvolvimento da inflamação. A cascata de recrutamento dos neutrófilos envolve os seguintes passos comumente reconhecidos: captura, rolamento, adesão firme e, finalmente, migração transendotelial (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). A liberação de neutrófilos pela medula óssea para o sangue circulante ocorre imediatamente após o primeiro sinal de inflamação, aumentando o número de neutrófilos disponíveis para recrutamento no tecido em resposta à inflamação. Esse processo de liberação é orquestrado pela citocina hematopoiética fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), assim ocorre a mobilização dos neutrófilos indiretamente, alterando o equilíbrio entre os ligantes CXCR4 e CXCR2 (SEMERAD *et al.*, 2002).

Em resposta à liberação de mediadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), o endotélio vascular adjacente é ativado. Proteínas de superfície celular da família de selectinas denominadas E- e P-selectina e seus ligantes (L-selectina) mediam essa captura inicial de neutrófilos (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013; ZINDEL; KUBES, 2019).

Durante a etapa de captura os carboidratos expressos por glicoproteínas membranares presentes nas superfícies dos neutrófilos fazem ligações de baixa intensidade com as moléculas de adesão P-selectina e E-selectina expressas em grande quantidade nas células endoteliais ativadas. Esse processo faz com que os neutrófilos circulantes sejam atraídos para a parede do vaso e rolem sobre o endotélio. Na etapa de rolamento os neutrófilos interagem com as quimiocinas presentes nas superfícies do endotélio e se aproximam do sítio inflamatório fazendo com que as L-selectinas sejam clivadas por enzimas, os neutrófilos sofrem alterações conformacionais em suas moléculas de adesão de alta afinidade e as células endoteliais aumentam a expressão de ligantes para essas moléculas (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

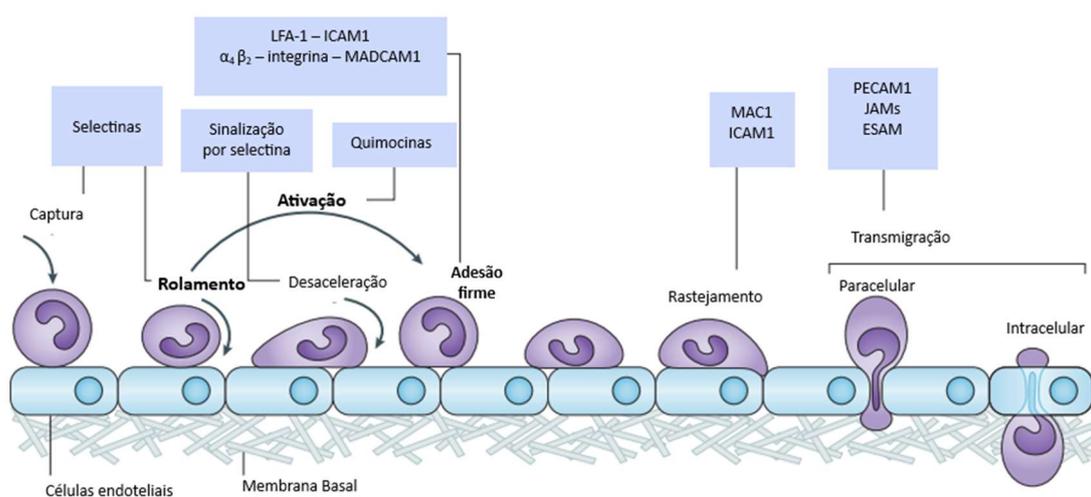
Então, as ligações de baixa afinidade dão lugar para as altíssimas afinidades iniciando assim a adesão firme. Essa etapa é mediada pela ligação entre as moléculas da família das  $\beta$ 2 integrinas como a proteína LFA 1 ou CD11a/CD18 (do inglês, *leukocyte function-associated antigen-1*) e a CR3 ou MAC-1 ou CD11b/CD18 (do inglês, *complement receptor 3*) presentes na superfície do neutrófilo com a ICAM-1 e ICAM-2 presentes no endotélio, fazendo com que os neutrófilos tenham alta afinidade com o endotélio e uma maior capacidade de responder aos sinais intracelulares controlando funções celulares importantes. Já estabelecido no endotélio, o neutrófilo sofre modificações em seu citoesqueleto e rastejando por entre os poros endoteliais dando início à migração para o sítio inflamatório, esse processo de migração pode se dar através da transmigração paracelular, ou seja, entre as junções das células endoteliais, ou através da célula endotelial, transcelular (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). É descrito que os neutrófilos fazem a transmigração, na maioria das vezes, pela via paracelular (PHILLIPSON *et al.*, 2008).

Agentes quimiotáticos como a IL-8, fragmentos da cascata do complemento (C5a, C3a), mediadores lipídicos (LTB<sub>4</sub>, PAF), mediadores exógenos como o N formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e moléculas liberadas pelas mitocôndrias de dano

celular como as Espécies reativas do oxigênio (EROs) são capazes de promoverem mudanças conformacionais nas integrinas e em filamentos de actina presentes no citoesqueleto (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; PETRI; SANZ, 2018).

Durante o processo de transmigração as células endoteliais também sofrem alterações no citoesqueleto e reorganizam sua ligação com a matriz extracelular (MEC) por meio de adesões focais (PARSONS *et al.*, 2012). Com auxílio das integrinas LFA-1 e MAC-1 os neutrófilos atravessam o revestimento das células endoteliais através da formação de estruturas conhecidas como *transmigratory cups*. Isso acontece devido a interação das integrinas entre as moléculas de adesão ICAM-1, ICAM-2, molécula de adesão celular vascular – 1 (VCAM-1), a proteína de junção PECAM-1 (do inglês *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), a JAM (molécula de adesão juncional) e ECAM (molécula de adesão celular epiteliais) em conjunto com outros componentes do citoesqueleto como os filamentos de f-actina. Outro mecanismo para a transmigração paracelular é o aumento dos níveis de cálcio intracelular promovendo a abertura de canais entre a célula endotelial por intermédio da ativação da enzima quinase de cadeia leve de miosina (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). A Figura 1 ilustra resumidamente a migração de neutrófilos.

Figura 1 - Sequência esquemática da migração de neutrófilos



Fonte: Adaptado de LEY *et al.*, 2007.

Os agentes quimiotáticos como a IL-8, fragmentos da cascata do complemento (C5a, C3a), mediadores lipídicos (LTB<sub>4</sub>, PAF), mediadores exógenos produzidos pela degradação do patógeno como o N formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e moléculas liberadas pelas mitocôndrias no caso de dano celular como as Espécies reativas do oxigênio (EROs) são capazes de promoverem as mudanças conformacionais nas integrinas e de levarem a polimerização da actina e a polarização da f-actina no citoesqueleto de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; PETRI; SANZ, 2018).

### **Produção de Espécies reativas do oxigênio (EROs)**

Fisiologicamente as células geram espécies reativas do oxigênio (EROs) como subprodutos das reações de transferência de elétrons que ocorrem no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Os neutrófilos produzem EROs como parte do seu mecanismo de defesa durante a inflamação, nomeado de *burst oxidativo*. Nesse processo a produção de  $\cdot\text{O}_2^-$  ocorre uma sequência de eventos metabólicos envolvendo o aumento do consumo de oxigênio, glicose e agentes redutores como o nucleotídeo nicotinamida adenosina fosfato reduzida (NADPH), e a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase (NOX) na membrana celular (DUPRÉ-CROCHET; ERARD; NÜBE, 2013).

A produção de EROs pode ser induzida por estímulos como o Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), um derivado do óleo croton que é capaz de ativar os neutrófilos. O PMA se liga diretamente a Proteína quinase C (PKC) expressa na superfície dos neutrófilos levando a montagem do complexo enzimático NOX e na ativação do *burst oxidativo*. Já a produção induzida por LPS é mediada pela ativação de TLR4 (JIN *et al.*, 2021).

Ânions superóxido promovem a adesão de leucócitos no endotélio, e que reações oxidativas catalisadas por  $\text{Fe}^{2+}$  produzem oxidantes que aumentam a síntese do fator de ativação plaquetário e de LTB<sub>4</sub> e a expressão de moléculas de adesão como CD11/CD18, P-Selectina, E-Selectina e ICAM (BALTA; KRAMER; SAMSTAG, 2021; GRISHAM; D. NEIL GRANGER; LEFER, 1998). Além disso, EROs influenciam a migração e adesão celular por meio da oxidação de proteínas sinalizadoras, da

oxidação da actina ou da oxidação de proteínas de ligação á actina como cofilina e L-plastina (BALTA; KRAMER; SAMSTAG, 2021; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019). Foi demonstrado que a oxidação da L-plastina reduziu sua capacidade de agrupar a actina e funções celulares dependentes, incluindo migração (BALTA *et al.*, 2019).

O desequilíbrio redox, em grande parte provocado pela produção excessiva de EROs em processos inflamatórios crônicos levam a danos celulares (CLAYTON *et al.*, 2021). Na AR a produção de EROs por neutrófilos ocorre devido a degranulação no líquido sinovial fazendo com que se forme um microambiente com altas concentrações de EROs, que levam à danos a cartilagem articular (GLENNON-ALTY *et al.*, 2018).

A ativação da via NADPH oxidase é também relevante no processo de NETose, uma vez que a inibição da via impediu a formação de NETs (FUCHS *et al.*, 2007). Bianchi e colaboradores (2009) demonstraram que a geração de EROs pela via NADPH oxidase é essencial na liberação de NET ao restaurar, por terapia gênica, as funções da enzima em um paciente com doença granulomatosa crônica, levando ao controle de uma infecção por *A. nidulans* e constatando *in vitro* que seus neutrófilos produziram NETs com propriedades microbicidas ao serem estimulados (BIANCHI *et al.*, 2009).

## **NETose**

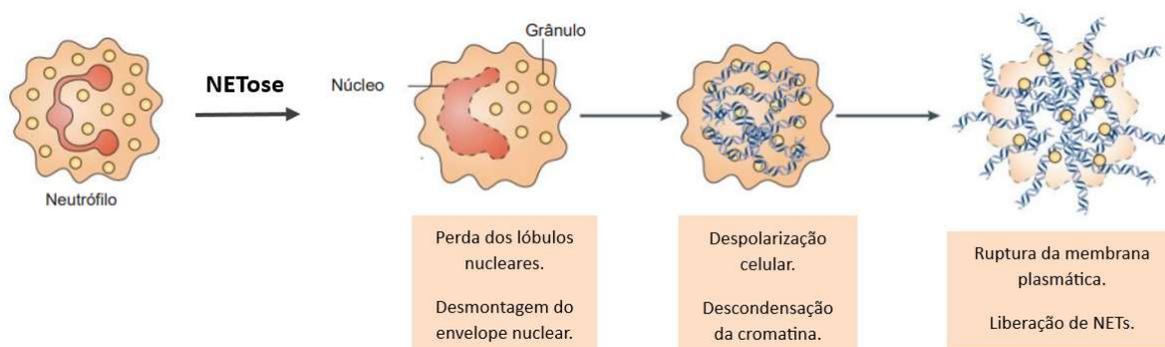
Brinkmann e colaboradores (2004) descreveram uma nova função efetora de neutrófilos contra microrganismos, em que essas células apresentam a capacidade de lançarem redes extracelulares compostas por DNA nuclear, podendo ter DNA mitocondrial, e proteínas nucleares e derivadas de seus grânulos citoplasmáticos. O mecanismo de extrusão dessas redes foi denominado NETose e as redes denominadas NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (BRINKMANN *et al.*, 2004; URBAN *et al.*, 2009).

O processo de NETose têm atraído cada vez mais atenção por serem um tipo de morte celular diferente da necrose e do apoptose, principalmente por não haver exposição da fosfatidilserina (FUCHS *et al.*, 2007; GOLDEMANN; MEDINA, 2013). Sabe-se que o processo de ativação da NETose tem envolvimento de receptores

específicos e de outras biomoléculas como: receptores IgG-Fc, TLRs, moléculas do sistema complemento, citocinas neutrofílicas e PAMPs ou DAMPs (BRINKMANN *et al.*, 2004; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007; MUNKS *et al.*, 2010; PIETERSE *et al.*, 2018).

O processo de formação das NETs é iniciado por estímulos que ativam vias AKT/mTOR (Proteína Cinase B/“*Mammalian Target of Rapamycin*”) e/ou ERK (cinases reguladas por sinal extracelulares) e a propagação dos mesmo (DAN DUNN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2018), ocasionando a geração de EROs através da via NADPH oxidase (NOX) durante a “explosão respiratória” de neutrófilos (VOROBEVA; PINEGIN, 2014). O núcleo perde seus lóbulos característicos e enzimas como elastase neutrofílica (NE) e MPO são transportadas para o núcleo onde promovem a descondensação da cromatina nuclear (**Figura 2**) (METZLER *et.al*, 2011; PAPAYANNOPOULOS *et.al*, 2010). Durante esse processo essas enzimas promovem a citrulinização de histonas, promovendo ainda mais a descondensação da cromatina, que consiste na conversão de arginina carregada em positivamente em citrulina. O processo é catalisado pela peptidilarginina deiminase 4 (PAD4) (WANG *et al.*, 2009).

Figura 2 - Ilustração resumida da liberação de NETs



Fonte: Adaptado de PAPAYANNOPOULOS, 2017

Em inflamações causadas por microrganismos as NETs desempenham, em grande parte dos casos, papel protetor, pois, são capazes de prender os microrganismos em suas fibras de cromatina descondensadas e histonas. Também é descrito a capacidade dessas redes em inativar fatores de virulência e até mesmo matar esses microrganismos, decorrente às proteínas presentes nessas estruturas

(JENNE *et al.*, 2013; OPASAWATCHAI *et al.*, 2019; PAPAYANNOPOULOS, 2017). Contudo, as NETs também estão envolvidas em processos fisiopatológicos, incluindo doenças autoimunes, podendo servir como alvos para a produção de autoanticorpos (NAKAZZAWA, 2012). Os neutrófilos, dentre muitas moléculas, liberam eicosanoides que estão envolvidos na sensibilização dos neurônios primários. Sabe-se que os neutrófilos presentes na AR possuem alta taxa de NETose, levando a uma maior produção de autoanticorpos decorrentes a maior exposição a antígenos citrulinados provenientes das NETs (CUNHA *et al.*, 2008; PAPADAKI *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado por Villanueva e colaboradores (2011) foi descrito que em diferentes modelos experimentais de doença autoimune as NETs mediam danos aos tecidos (VILLANUEVA *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que os componentes da NET são reconhecidos como DAMPs, transformando assim a NETose em um processo de amplificação da resposta imune em doenças autoimunes (JORCH; KUBES, 2017). No diabetes mellitus do tipo 1 as NETs contribuem para a progressão da doença, assim como na Aterosclerose (HERRERO-CERVERA; SOEHNLEIN; KENNE, 2022).

No modelo experimental de Artrite Induzida por Antígeno, Schneider e colaboradores (2021) mostraram que a injeção NETs provenientes de camundongos com inflamação articular causam aumento do edema articular, produção de citocinas inflamatórias e a expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) em camundongos saudáveis. Os autores também descreveram que neutrófilos provenientes de pacientes com AR tinham maior capacidade de liberar NETs, confirmando dados já publicados, porém os autores correlacionaram o achado com a dor, e propuseram que a concentração de NETs está relacionada com o aumento da dor. Os dados contribuem para que a via possa ser uma alternativa para o tratamento da patogênese da AR, contribuindo para a melhora de sintomas como a dor (SCHNEIDER *et al.*, 2021).

As formações de NETs ocorrem por estímulos presentes no contexto inflamatório. Sendo assim, citocina como IL-8, produtos sintéticos como PMA e fMLP, ou moléculas oriundas de microorganismos como LPS são capazes de induzir o processo de NETose, contudo, a composição das NETs pode variar de acordo com o estímulo usado para indução (DWYER *et al.*, 2014; HOPPENBROUWERS *et al.*, 2017).

## Apoptose

Em 1972 Kerr e colaboradores descreveram o processo de apoptose ao estudar fígado de ratos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). O processo pode ser caracterizado pelo empacotamento da cromatina e dos fragmentos nucleares, sendo marcado por alterações morfológicas que levam a redução do núcleo e volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, externalização de fosfatidilserina (FS), alteração do potencial de membrana mitocondrial e algumas modificações nas organelas citoplasmáticas (PÉREZ-FIGUEROA *et al.*, 2021). A membrana de neutrófilos apoptóticos sofre alterações para facilitar a fagocitose dos corpos apoptóticos pelos macrófagos, porém permanece intacta não induzindo a continuidade do processo inflamatório e nem o dano tecidual (LI *et al.*, 2020).

Os neutrófilos entram em apoptose reduzindo a quimiotaxia, desgranulação e produção EROs, e geram sinais pró-apoptóticos. Com isso, o fluxo de neutrófilos para o sítio inflamado é reduzido e o recrutamento de macrófagos anti-inflamatórios (M2) é aumentado (D'ARCY, 2019; DEJAS *et al.*, 2023). Esse processo pode ser induzido por sinais intracelulares que ativam a via intrínseca, também conhecido por apoptose espontânea ou constitutiva, ou extracelulares que ativam a via extrínseca. Esses sinais levam a alterações morfológicas e bioquímicas que resultam na ativação de caspases 3, 8, 9. As caspases são proteases intracelulares responsáveis pela indução e execução da apoptose, e podem ser classificadas como executoras, as que dão início a cascata apoptótica (caspases 8 e 9), ou efetoras, as que são ativadas pelas executoras (caspases 3, 6 e 7) (PÉREZ-FIGUEROA *et al.*, 2021).

A via intrínseca ocorre quando os níveis de expressão das proteínas da família BCL-2 estão baixos. Mediada por proteínas pró-apoptóticas da família Bax e Bak, ou pela inibição da proteína anti-apoptótica da família BCL-2, ocorre a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) induzindo a formação de poros que levam a alteração do potencial membranar, permitindo assim a liberação do citocromo C e de outros fatores pró-apoptóticos para o citosol. Após o citocromo C ser liberado juntamente com o fator ativador de protease de apoptose (APAF) é formado o apoptossoma que recruta e ativa caspase-9 e caspase-3 (DEJAS *et al.*, 2023; WINTERBOURN; KETTLE, 2013).



apoptose nesse tipo celular (GABELLONI *et al.*, 2013; PÉREZ-FIGUEROA *et al.*, 2021).

### **Medicamentos anti-inflamatórios**

Os anti-inflamatórios são fármacos utilizados a fim de modular o processo inflamatório. As doenças inflamatórias são tratadas com medicamentos desenvolvidos para controlar a resposta inflamatória através da inibição de enzimas, bloqueio de receptores ou antagonismo de ligantes específicos (PERRETTI *et al.*, 2015; SCOTTI; SCOTTI, 2022). É importante lembrar que a inflamação é um processo fisiológico, todavia, de forma exacerbada pode levar a danos teciduais provocando respostas indesejáveis como a dor crônica (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). Esses fármacos se diferenciam entre anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), e são capazes de inibir a produção e/ou ação de mediadores inflamatório e até mesmo impedir o recrutamento e ativação de neutrófilos (PERRETTI *et al.*, 2015).

Os AINEs têm maior utilização e sua indicação está relacionada com a regulação da fase aguda por possuírem efeito anti-inflamatório, anti-pirético e analgésico, aliviando sintomas de dor e edema. Também são utilizados associados com outros medicamentos para o tratamento de condições crônicas como artrite reumatoide e colite ulcerativa. Essa classe de fármaco atua sobre as isoformas das enzimas prostaglandinas sintetases (COX), levando a inibição da síntese de um grupo de mediadores químicos inflamatórios denominados de eicosanoides. Contudo, a inibição da produção de alguns eicosanoides como os tromboxanos e as prostaglandinas contribuem para a ocorrência de efeitos colaterais, uma vez que esses estão também envolvidos em funções fisiológicas relevantes (BACCHI *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2022).

Já os glicocorticoides ou AIEs atuam modulando a transcrição de genes inflamatórios e causam efeitos em todos os sistemas orgânicos, ainda que sejam potentes anti-inflamatórios estão relacionados com inúmeros efeitos colaterais como alterações endócrinas e metabólicas. Estes formam uma classe de fármacos com ampla diversidade estrutural, mas com propriedades terapêuticas e farmacológicas bastante semelhantes. São utilizados no tratamento de grande parte das doenças

inflamatórias e imunológicas como AR, doença de Crohn, asma e lúpus. Essa classe de fármaco pode inibir a ativação de genes pró-inflamatórios como genes de quimiocinas e moléculas de adesão como da fosfolipase A2, gene responsável por liberar ácido araquidônico para a metabolização de COX e lipooxigenase (LOX). Ou ainda estimular a transcrição de genes anti-inflamatórios (ORAY *et al.*, 2016; VANDEWALLE *et al.*, 2018).

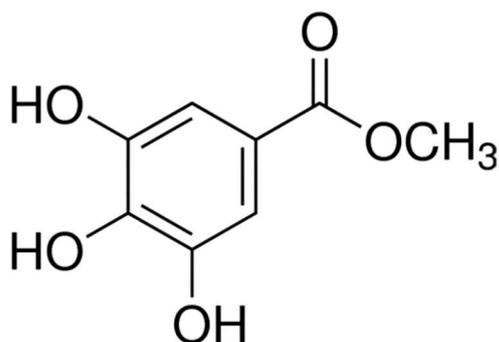
Em muitas doenças inflamatórias crônicas como asma, lúpus e doença de Crohn é possível realizar tratamento com medicamentos biológicos que possuem como alvo receptores de superfície, moléculas de sinalização intracelular e citocinas envolvidas na resposta inflamatória (GHOSH *et al.*, 2010; YAMASHITA *et al.*, 2023). Todavia, o uso desses fármacos possui limitações de via de administração, sérios efeitos colaterais hepáticos, gastrointestinais e renais, e altos custos de tratamento. (CHIARELLA, 2019).

Tendo em vista que as terapias utilizadas para o tratamento da inflamação crônica a longo prazo podem levar a efeitos colaterais sérios e custos elevados, fármacos derivados de plantas tem se apresentado como uma alternativa de tratamento adjuvante de baixo custo, uma vez que os produtos naturais podem modular sinais pró-inflamatórios (DUDICS *et al.*, 2018; SCOTTI; SCOTTI, 2022). Os polifenóis são uma classe de derivados de plantas que desempenham dentre muitas propriedades, a atividade anti-inflamatória e podem ser ótimos agentes terapêuticos (KARASAWA *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2021).

### **Galato de metila**

O galato de metila (GM) (3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila) (**Figura 4**), um éster metílico do ácido gálico, é um composto polifenólico encontrado em diversas plantas medicinais e alimentares como a *Schinus terebinthifolius* e *Rosa rugosa* conhecido por suas atividades biológicas. (KANG *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2023) O uso de derivados de plantas medicinais como agentes terapêuticos tem sido amplamente estudado nos últimos anos em decorrência da facilidade de acesso. O GM devido aos seus diversos efeitos biológicos tem se mostrado um potencial agente terapêutico (LIANG *et al.*, 2023; SCOTTI; SCOTTI, 2022).

Figura 4 - Estrutura química da substância galato de metila



Foi mostrado que o GM reduz o estresse oxidativo e atua na neuroproteção e na proteção hepática revelando um efeito antioxidante da substância (CRISPO *et al.*, 2010; HSIEH *et al.*, 2004; LUBIS *et al.*, 2018). O GM também é conhecido por outros efeitos biológicos como antimicrobiano (KANG *et al.*, 2009) antitumoral (LEE *et al.*, 2010) e anti-inflamatório (CORREA *et al.*, 2016).

Em um modelo de inflamação intestinal o GM inibiu a via de sinalização TLR4/NFκB e regulou a polarização de macrófagos diminuindo o processo inflamatório (ZHOU *et al.*, 2022). Já em modelos de inflamação articular o GM inibiu o recrutamento de leucócitos, a ativação de macrófagos e a produção de mediadores inflamatórios demonstrando um efeito anti-inflamatório (CORREA *et al.*, 2016) Também foi descrito que o GM inibe MAPK e a expressão de COX2 em macrófagos murinos ativados *in vitro* (CORREA *et al.*, 2020). Contudo, não é elucidado o efeito do GM na atividade dos neutrófilos, o que é proposto pelo presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AKTORIES, K. *et al.* Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 572–581, set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543189/>>
- ATHENS, J. W. *et al.* LEUKOKINETIC STUDIES. IV. THE TOTAL BLOOD, CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE IN NORMAL SUBJECTS. **Journal of Clinical Investigation**, v. 40, n. 6, p. 989–995, 1 jun. 1961. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13684958/>>
- AZCUTIA, V. *et al.* Sialylation regulates neutrophil transepithelial migration, CD11b/CD18 activation, and intestinal mucosal inflammatory function. **JCI Insight**, v. 8, n. 5, 8 mar. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10077474/pdf/jciinsight-8-167151.pdf>>
- BACCHI, S. *et al.* Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 52–64, 1 set. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22934743/>>
- BALTA, E. *et al.* Spatial oxidation of L-plastin downmodulates actin-based functions of tumor cells. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4073, 9 set. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-11909-z>>
- BALTA, E.; KRAMER, J.; SAMSTAG, Y. Redox Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cell Migration and Adhesion: On the Way to a Spatiotemporal View. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 28 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33585453/>>
- BIANCHI, M. *et al.* Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2619–2622, 24 set. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541821/>>
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21094463/>>
- BOIVIN, G. *et al.* Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2762, 2 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32488020/>>
- BRÉCHARD, S.; BUEB, J.-L. .; TSCHIRHART, E. J. Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. **Cell Calcium**, v. 37, n. 6, p. 531–540, jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2517086/>>

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–5, 5 mar. 2004. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001782/>>

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 577–582, ago. 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17632569/>>

CAPUCETTI, A.; ALBANO, F.; BONECCHI, R. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 9 jul. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32733442/>>

CHIARELLA, S. E. Immunobiologic treatments for severe asthma, atopic dermatitis, and chronic urticaria. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 40, n. 6, p. 485–489, 1 nov. 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31690400/>>

CLAYTON, S. A. *et al.* Mitochondria as Key Players in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 29 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33995417/>>

CRISPO, J. A. G. *et al.* Protective effects of methyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 773–778, 19 mar. 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20171161/>>

CORREA, L. B. *et al.* Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1554–1566, 24 jun. 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27227459/>>

CORREA, L. B. *et al.* Methyl gallate attenuates inflammation induced by Toll-like receptor ligands by inhibiting MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]**, v. 69, n. 12, p. 1257–1270, 1 dez. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33037469/>>

COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 11–28, 25 ago. 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27558325/>>

CUNHA, T. M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 22 jan. 2008. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18203872/>>

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 25 abr. 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>>

DAMASCENA, H. L. *et al.* Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). **Cells**, v. 11, n. 18, p. 2889, 16 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36139464/>>

DAN DUNN, J. *et al.* Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, v. 6, p. 472–485, dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432659/>>

DE BRITO, T. M. *et al.* Anti-Inflammatory Activity and Chemical Analysis of Different Fractions from *Solidago chilensis* Inflorescence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 7612380, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34745422/>>

DEJAS, L. *et al.* Regulated cell death in neutrophils: From apoptosis to NETosis and pyroptosis. **Seminars in Immunology**, v. 70, p. 101849, 1 nov. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37939552/>>

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 378–391, jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231052/>>

DE OLIVEIRA, T. H. C. *et al.* Intravital Microscopic Evaluation of the Effects of a CXCR2 Antagonist in a Model of Liver Ischemia Reperfusion Injury in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1917, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29379500/>>

DIHYDRORHODAMINE 123. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/br/pt/D23806>>. Acesso em: 7 fev. 2024.

DOWEY, R. *et al.* Enhanced neutrophil extracellular trap formation in COVID-19 is inhibited by the protein kinase C inhibitor ruboxistaurin. **ERJ Open Research**, v. 8, n. 2, p. 00596-2021, 27 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8801155/>>

DUDICS, S. *et al.* Natural Products for the Treatment of Autoimmune Arthritis: Their Mechanisms of Action, Targeted Delivery, and Interplay with the Host Microbiome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2508, 24 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30149545/>>

DUPRÉ-CROCHET, S.; ERARD, M.; NÜBE, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 657–670, out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23610146/>>

DWYER, M. *et al.* Cystic Fibrosis Sputum DNA Has NETosis Characteristics and Neutrophil Extracellular Trap Release Is Regulated by Macrophage Migration-Inhibitory Factor. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 6, p. 765–779, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24862346/>>

ELMORE, S. Apoptosis: a Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17562483/>>

FLESHNER, M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 27, p. 1–7, jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964544/>>

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 149–164, 11 ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931059/>>

FUCHS, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 8 jan. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210947/>>

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 638–650, 1 nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994464/>>

GABELLONI, M. L. *et al.* Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 423–437, 1 fev. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-013-0364-x>>

GHOSH, N. *et al.* Mechanisms and Efficacy of Immunobiologic Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. **International Reviews of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 4–37, 25 jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20100080/>>

GLENNON-ALTY, L. *et al.* Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. v. 125, p. 25–35, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29605448/>>

GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23335924/>>

GRANOT, Z. *et al.* Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung. **Cancer Cell**, v. 20, n. 3, p. 300–314, set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21907922/>>

GRISHAM, M. B.; D. NEIL GRANGER; LEFER, D. J. Modulation of leukocyte–endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 404–433, 1 set. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741579/>>

GUPTA, S. *et al.* Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. **Proceedings of the National Academy of**

**Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16481–16491, 29 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32601182/>>

HADDAD, E.-B. *et al.* Role of p38 MAP kinase in LPS-induced airway inflammation in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 8, p. 1715–1724, abr. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1572739/>>

HASSAN, M. S. A. *et al.* Anti-inflammatory activity of pyridazinones: A review. **Archiv Der Pharmazie**, v. 355, n. 8, p. e2200067, 1 ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35532263/>>

HAYASHI, F.; MEANS, T. K.; LUSTER, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2660–2669, 1 out. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829592/>>

HERRERO-CERVERA, A.; SOEHNLEIN, O.; KENNE, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, 17 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8803838/>>

HIDALGO, A.; CASANOVA-ACEBES, M. Dimensions of neutrophil life and fate. **Seminars in Immunology**, v. 57, p. 101506, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34711490/>>

HOPPENBROUWERS, T. *et al.* In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0176472, 9 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28486563/>>

HSIEH, T.-J. *et al.* Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. v. 42, n. 5, p. 843–850, 1 maio 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15046831/>>

JENNE, CRAIG N. *et al.* Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 2, p. 169–180, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23414757/>>

JIN, Y. *et al.* The Differential Reactive Oxygen Species Production of Tear Neutrophils in Response to Various Stimuli In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12899–12899, 29 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657846/>>

JORCH, S. K.; KUBES, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 3, p. 279–287, 7 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267716/>>

KANG, M.-S. *et al.* Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**,

v. 47, n. 6, p. 760–767, 1 dez. 2009. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127471/>>

KARASAWA, K. *et al.* A Matured Fruit Extract of Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.) Stimulates the Cellular Immune System in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11287–11293, 3 out. 2011. Disponível em:  
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21936496/>>

KAUFMANN, S. H. E. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 705–712, 1 jul. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563076/>>

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4561027/>>

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435331/>>

KRÉMER, V. *et al.* Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1301183, 2023. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38077317/>>

KUMAR, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps: Formation and Involvement in Disease Progression. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 17, n. 3, p. 208–220, 1 jun. 2018. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29908538/>>

LEE, H. *et al.* Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 11, p. 6698–6705, 1 dez. 2010. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21048105/>>

LEE, K. H. *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 11, p. 1160–1173, nov. 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899799/>>

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717539/>>

LI, K.-X. *et al.* LTB<sub>4</sub>-induced anti-apoptosis and infiltration of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 38, n. 3, p. 543–551, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32105594/>>

LIANG, H. *et al.* Methyl gallate: Review of pharmacological activity. **Pharmacological Research**, v. 194, p. 106849–106849, 1 ago. 2023. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37429335/>>

LIESCHKE, G. J. *et al.* Mice lacking both macrophage- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have macrophages and coexistent osteopetrosis and severe lung disease. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 27–35, 1 jul. 1994. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8018921/>>

LIU, K.; WANG, F.-S.; XU, R. Neutrophils in liver diseases: pathogenesis and therapeutic targets. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 1, p. 38–44, 1 jan. 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33159158/>>

LUBIS, M. Y. *et al.* METHYL GALLATE FROM JIRINGA (ARCHIDENDRON JIRINGA) AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 1, p. 346, 1 jan. 2018. Disponível em: < [https://www.semanticscholar.org/paper/METHYL-GALLATE-FROM-JIRINGA-\(ARCHIDENDRON-JIRINGA\)-Lubis-Sibirian/d44644a35c464779b855f23d67e6945a28c416d0](https://www.semanticscholar.org/paper/METHYL-GALLATE-FROM-JIRINGA-(ARCHIDENDRON-JIRINGA)-Lubis-Sibirian/d44644a35c464779b855f23d67e6945a28c416d0)>

MAI, L. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase and pain. **Life Sciences**, v. 256, p. 117885, set. 2020. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320520306354?via%3DiHub>>

MANTOVANI, A. *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 1 ago. 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21785456/>>

MCCORMICK, B.; CHU, J. Y.; VERMEREN, S. Cross-talk between Rho GTPases and PI3K in the neutrophil. **Small GTPases**, v. 10, n. 3, p. 187–195, 17 abr. 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6548295/>>

MCCRACKEN, J. M.; ALLEN, L.-A. H. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. **Journal of Cell Death**, v. 7, p. JCD.S11038, jan. 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278783/>>

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, mar. 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303867/>>

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, CHARLES. J. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 89–97, fev. 2000. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10719670/>>

METCHNIKOFF, E. Lesson on the comparative pathology of inflammation. **Ann. Inst. Pasteur**. 1983

METZLER, K. D. *et al.* Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 953–959, 20 jan. 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974672/>>

MUÑOZ-CARO, T. *et al.* NADPH oxidase, MPO, NE, ERK1/2, p38 MAPK and Ca<sup>2+</sup> influx are essential for *Cryptosporidium parvum*-induced NET formation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 52, n. 2, p. 245–254, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026247/>>

NAKAZAWA, D. *et al.* Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculiti. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 11, p. 3779–3787, 27 out. 2012. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22777766/>>

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 19 mar. 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303877/>>

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–611, 18 jun. 2014. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24940954/>>

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, 22 jan. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31969717/>>

OPASAWATCHAI, A. *et al.* Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 11 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30687301/>>

ORAY, M. *et al.* Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, n. 4, p. 457–465, 6 fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26789102/>>

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661–674, 17 abr. 2013. Disponível em: < <https://www.embopress.org/doi/full/10.1002/emmm.201202382>>

PAPADAKI, G. *et al.* Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 11, p. 2542–2554, 5 out. 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27585946/>>

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, 9 out. 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28990587/>>

PAPAYANNOPOULOS, V. *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 25 out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974816/>>

PARK, D. *et al.* Root Bark of *Paeonia suffruticosa* Extract and Its Component Methyl Gallate Possess Peroxynitrite Scavenging Activity and Anti-Inflammatory Properties through NF- $\kappa$ B Inhibition in LPS-treated Mice. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3483, 25 set. 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31557976/> >

PARK, J.-K. *et al.* Methyl Gallate Suppresses Tumor Development by Increasing Activation of Caspase3 and Disrupting Tumor Angiogenesis in Melanoma. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2022, p. 6295910, 6 set. 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36110191/> >

PARSONS, S. A. *et al.* Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 436–446, 1 fev. 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22095445/> >

PATIDAR, A. *et al.* DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor. **Cytokine**, v. 104, p. 114–123, abr. 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29032985/> >

PEISELER, M.; KUBES, P. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 7, p. 2629–2639, 17 jun. 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6597202/> >

PENG, Y. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 15, p. 4503–4525, 2 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8572027/pdf/dddt-15-4503.pdf>>

PÉREZ-FIGUEROA, E. *et al.* Neutrophils: Many Ways to Die. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 4 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7969520/>>

PETRI, B.; SANZ, M.-J. Neutrophil chemotaxis. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 425–436, 19 jan. 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29350282/> >

PERRETTI, M. *et al.* Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 11, p. 737–755, nov. 2015. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26478210/> >

PHILLIPSON, M. *et al.* Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1649, 20 fev. 2008. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18297135/> >

RAMOJI, A. *et al.* Toward a spectroscopic hemogram: Raman spectroscopic differentiation of the two most abundant leukocytes from peripheral blood. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 12, p. 5335–5342, 19 jun. 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22721427/> >

REES, D. J. VAN *et al.* Immunoreceptors on neutrophils. **Seminars in immunology**, v. 28, n. 2, p. 94–108, 1 abr. 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26976825/>>

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–460, out. 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21839682/>>

SATO, T. *et al.* Molecular Mechanisms of N -Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced Superoxide Generation and Degranulation in Mouse Neutrophils: Phospholipase D Is Dispensable. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 1, p. 136–145, jan. 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23109426/>>

SCHNEIDER, A. H. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate joint hyperalgesia induced by immune inflammation. **Rheumatology**, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33367912/>>

SCHUTT, C.; SIEGEL, D. M. Autoinflammatory Diseases/Periodic Fevers. **Pediatrics in Review**, v. 44, n. 9, p. 481–490, 1 set. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37653132/>>

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Natural Products as Anti-Inflammatory Agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 25, n. 14, p. 2315–2316, dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36330656/>>  
SEMERAD, C. L. *et al.* G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. **Immunity**, v. 17, n. 4, p. 413–423, out. 2002. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12387736/>>

SINGHAL, A.; KUMAR, S. Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation. **Immunology**, 26 out. 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34704249/>>

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20498669/>>

SYTOX GREEN STAIN – US. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/sytox-green-stain.html>>. Acesso em: 7 fev. 2024.

URBAN, C. F. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000639, 30 out. 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19876394/>>

VANDEWALLE, J. *et al.* Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42–54, jan. 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29162310/>>

VILLANUEVA, E. *et al.* Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 538–552, 25 maio 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21613614/>>

VOROBJEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of formation and role in health and disease. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 12, p. 1286–1296, dez. 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25716722/>>

XU, N.; HOSSAIN, M.; LIU, L. Pharmacological inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases affects KC/CXCL1-induced intraluminal crawling, transendothelial migration, and chemotaxis of neutrophils in vivo. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 290565, 2013. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/290565/>>

WANG, Y. *et al.* Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **Journal of Cell Biology**, v. 184, n. 2, p. 205–213, 19 jan. 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19153223/>>

WEINBERG, F.; RAMNATH, N.; NAGRATH, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1191, 16 ago. 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31426364/>>

WIGERBLAD, G.; KAPLAN, M. J. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, 18 out. 2022. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41577-022-00787-0>>

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642–660, 20 fev. 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22881869/>>

YAMASHITA, M. *et al.* The Immunobiological Agents for Treatment of Antiglomerular Basement Membrane Disease. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 59, n. 11, p. 2014, 16 nov. 2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10673378/>>

YUAN, C.-H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3831–3850, 18 dez. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528293/pdf/viruses-04-03831.pdf>>

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 11–18, jan. 2005. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15686620/>>

ZHOU, P. *et al.* Methyl Gallate Alleviates Acute Ulcerative Colitis by Modulating Gut Microbiota and Inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14024, 14 nov. 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36430509/>>

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, jun. 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6877845/>>

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 1, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675482/>>