UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

AYDA HENRIQUES SCHNEIDER

Papel das NETs como indutoras de dor articular na artrite reumatoide

Ribeirão Preto

2019

AYDA HENRIQUES SCHNEIDER

Papel das NETs como indutoras de dor articular na artrite reumatoide

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área:
Farmacologia**

Orientador: Fernando de Queiróz Cunha

Ribeirão Preto

2019

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Schneider, Ayda Henriques.

Papel das NETs como indutoras de dor articular na artrite reumatoide.

74p; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Cunha, Fernando de Queiróz.

1.artrite reumatoide. 2.dor articular. 3.neutrófilos. 4.NETs.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ayda Henriques Schneider

Papel das NETs como indutoras de dor articular na artrite reumatoide

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr Fernando de Queiróz Cunha – FMRP USP

Assinatura: _____

Examinador 1:

Assinatura: _____

Examinador 2:

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de

São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que lutam pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fernando de Queiróz Cunha, pela orientação, dedicação e por acreditar no meu potencial.

À banca pela disponibilidade e pelas certas colocações que contribuirão para minha formação.

Aos professores Tarcília Aparecida da Silva, Paulo Louzada Júnior, Sandra Yasuyo Fukada Alves, José Carlos Alves Filho e Thiago Mattar Cunha pelas contribuições científicas.

Aos técnicos Kátia Santos, Sérgio Rosa, Diva Montanha, Ieda Regina, Marcela Grando e Juliana Abumansur pela dedicação ao laboratório. Também aos técnicos dos biotérios pelos cuidados com os animais.

Ao grupo do Laboratório de Imunologia Molecular do Hospital das Clínicas: Lívia Ambrósio, Caio Machado e Flávio Falcão, pessoas que sempre me ajudaram e com quem tive o prazer de trabalhar e conviver.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Dor, em especial: César, Valter, Jéssica, Vanessa, Flávio Protásio e Rafael Ferreira.

Aos que colaboraram com esse projeto: Caio Cavalcante, Flávio Falcão, Lívia Barroso, Alexandre Gomes, Paula Barbim e Cíntia Heluany.

Ao Alexandre Kanashiro, que vem me ajudando desde a graduação e é um exemplo como profissional e como ser humano.

Ao coordenador da pós-graduação em farmacologia, Professor Doutor Leonardo Resstel pelos conselhos e ensinamentos.

À Gislaine, sempre muito prestativa e dedicada com os alunos.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro, o qual permitiu que esse projeto se concretizasse.

À minha mãe que sempre me apoiou e me ensinou que a educação é o melhor caminho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental do modelo de AIA.

Figura 2. Aumento de NETs e da expressão gênica de Padi4 no modelo de AIA.

Figura 3. Efeito da degradação das NETs na doença experimental

Figura 4. Efeito da injeção de NETs nas articulações.

Figura 5. Efeito da injeção de NETs na expressão de COX-2 articular.

Figura 6. Efeito da injeção de NETs nas articulações de camundongos TLR-4 -
/-.

Figura 7. Aumento de NETs nas articulações de pacientes com AR.

Figura 8. Aumento de NETs em neutrófilos isolados de pacientes com AR e
correlação com escore de dor.

RESUMO

SCHNEIDER, AH. **Papel das NETs como indutoras de dor articular na artrite reumatoide**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que tem como um dos principais sintomas a dor articular. Durante o processo inflamatório, nociceptores são ativados por mediadores nociceptivos, como por exemplo a prostaglandina E_2 e via IL-1 β . É conhecido o papel fundamental dos neutrófilos na liberação de estímulos nociceptivos, entretanto, não é conhecido o papel das *neutrophil extracellular traps* liberadas por esses neutrófilos em doenças autoimunes como a artrite, na gênese da dor articular. Nossos resultados demonstraram que animais com artrite induzida por antígeno (AIA) possuem um aumento de NETs relacionado com o aumento da expressão gênica de Pad4, enzima fundamental para a geração de NETs. A degradação dessas NETs através de DNase é capaz de reduzir parâmetros da doença, como o edema, hiperplasia da sinóvia, infiltrado celular, e a hipernocicepção, apesar de não haver alteração na migração dos neutrófilos para as articulações. A partir disso, nossos resultados seguintes demonstraram que as NETs são capazes de induzir hipernocicepção em camundongos e que essa queda no limiar mecânico pode ocorrer devido aumento da expressão de COX-2, o que possivelmente leva a uma ativação de prostaglandinas. Além disso, ocorre aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente via ativação de receptores Toll-4 pelo reconhecimento das histonas dessas NETs. Ademais, pacientes com AR possuem aumento de NETs nos líquidos sinoviais e neutrófilos mais propensos a produzirem NETs, as quais têm relação com o aumento da escala de dor nesses pacientes. Deste modo, podemos propor um novo alvo para o tratamento de dor articular.

Palavras-chave: artrite reumatoide, dor articular, neutrófilos, NETs.

ABSTRACT

SCHNEIDER, AH. **Role of NETs as inducers of joint pain in rheumatoid arthritis.** Thesis (Master) – Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that has as one of the main joint symptoms. During the inflammatory process, nociceptors are activated by nociceptive media, such as prostaglandin E₂ and via IL-1 β . The role of neutrophils in the release of nociceptive stimuli is known, however, the role of neutrophil extracellular traps released by these neutrophils in autoimmune diseases as an arthritis in the origin of joint pain is not known. Our results demonstrated that animals with antigen-induced arthritis (AIA) have an increase in NETs related to the increase in Pad4 gene expression, a fundamental enzyme for the generation of NETs. Degradation of these NETs through DNase can reduce disease levels such as edema, synovial hyperplasia, cellular infiltrate and hypernociception, although there is no change in neutrophils to joints. From this, our results demonstrated as NETs are able to induce hypernociception in mice and that probably no mechanical mechanism limit may occur the increased expression of COX-2, or leading to prostaglandin. In addition, there is an increased concentration of proinflammatory cytokines, possibly via activation of Toll-4 receptors by recognizing the histories of these NETs. In addition, RA patients have increased NETs at synovial and neutrophil levels more likely to produce NETs, as they are related to increasing patient scale. In this mode we can propose a new target for the treatment of joint pain.

Key words: rheumatoid arthritis, joint pain, neutrophils, NETs.

LISTA DE ABREVIATURAS

-/-: deficientes para

ACPAs: anticorpos anti-proteínas citrulinadas

AIA: artrite induzida por antígeno

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

AMP: adenosina monofosfato

ANOVA: análise de variância

AR: artrite reumatoide

ATP: adenosina trifosfato

COX: ciclooxigenase

CT: controle

DAMPs: padrões moleculares associados ao dano

DMARDs: drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença

DNA: ácido desoxirribonucleico

EROs: espécies reativas de oxigênio

FR: fator reumatoide

i.a: intra-articular

i.p: intra-peritoneal

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor

IFN: interferon

IL: interleucina

KC: quimiocina derivada de queratinócitos

LPS: lipopolissacarídeo

mBSA: albumina sérica bovina metilada

MPO: mieloperoxidase

MTX: metotrexato

NE: elastase de neutrófilos

NETs: neutrophil extracellular traps

PADI-4: peptidilarginina deiminase 4

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PGE₂: prostaglandina E₂

PMA: acetato miristato de forbol

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

s.c: subcutânea

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

TLR: receptor semelhante ao Toll

TNF: fator de necrose tumoral

TNFR1: receptor do fator de necrose tumoral

Tregs: células T reguladoras

ZYM: zimosan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Artrite reumatoide.....	16
1.2. Modelo experimental de artrite – Artrite Induzida por Antígeno (AIA)....	18
1.3. Dor articular.....	19
1.4. Neutrófilos.....	22
1.5. <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	24
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57
9. ANEXO 1.....	71
10. ANEXO 2.....	74

1. INTODUÇÃO

1.1. Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune de caráter inflamatório, onde a desregulação do sistema imunológico causa lesão ao tecido sinovial, o qual é responsável pelo revestimento das articulações. Esse dano é caracterizado por uma inflamação denominada sinovite, a qual tem como um dos seus efeitos o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese. Esse processo facilita o aumento da migração leucocitária e altera a organização do tecido sinovial, formando o chamado *pannus*. Na AR são afetadas as pequenas e grandes articulações periféricas, como as das mãos, dos pulsos, dos joelhos, dos pés e dos tornozelos (Kennedy et al., 2010; Zamanpoor, 2019).

A AR é caracterizada pela presença de autoanticorpos, os quais podem ser encontrados no sangue e no fluido sinovial de pacientes artríticos. Dentre os principais, temos os anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs) e o fator reumatoide (FR), utilizados atualmente como biomarcadores da doença, auxiliando no diagnóstico de pacientes e também no direcionamento de tratamentos adequados, entretanto, alguns pacientes são considerados soronegativos (van der Linden et al., 2009). É importante ressaltar que esses autoanticorpos podem ser encontrados, muitas vezes, na fase inicial da AR, a qual ocorre antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos (Derksen et al., 2017).

Estima-se que a prevalência de AR seja de 0,5 a 1% da população mundial adulta (McInnes & Schett, 2011). Pacientes com AR têm um aumento da

prevalência de doenças psiquiátricas, como por exemplo, a depressão, uma das principais comorbidades que afeta os indivíduos artríticos, em comparação com o restante da população (van't Land et al., 2010; Baerwald et al., 2019). A depressão nesses indivíduos é associada com um aumento da dor, inflamação e incapacitação (Edwards et al., 2011). Ademais, a depressão é um dos fatores que leva à descontinuidade do tratamento (DiMatteo et al., 2000). Ainda, é importante citar que existe uma perda de produtividade dos indivíduos com AR (Sullivan et al., 2010).

A etiologia da AR ainda não se encontra totalmente esclarecida. Atualmente, sabe-se que a AR é uma desordem multifatorial, da qual participam fatores genéticos, como por exemplo as alterações no gene HLA-DRB (Deighton et al., 1989), ambientais, como o tabagismo (Talbot et al., 2018), e fatores hormonais, visto que as mulheres são três vezes mais acometidas pela doença em relação aos homens (Ostensen, 1999; Khalifa et al., 2016). Ademais, existem estudos que demonstram que ocorre um aumento da expressão dos receptores Toll (TLRs) dos tipos 2 e 4 no tecido sinovial de pacientes com AR, e que o tratamento com os antagonistas farmacológicos do TLR-2 e TLR-4 acarreta em uma melhora sintomática da doença (Radstake et al., 2004).

As drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença, conhecidas como DMARDs, são amplamente utilizadas na clínica por serem capazes de reduzir as lesões articulares (Wassenberg & Rau, 2002). O exemplo mais conhecido de DMARD é o metotrexato (MTX), sendo o tratamento farmacológico de escolha para pacientes com AR. Seu mecanismo de ação está relacionado com o aumento dos níveis de adenosina, através da inibição da enzima AICAR (ribonucleótido aminoimidazocarboxamida) transformilase, promovendo o acúmulo de AICAR, cujo metabólito inibe diretamente a enzima adenosina deaminase, enzima que converte

adenosina em inosina, permitindo então o acúmulo de adenosina no citoplasma. Os níveis aumentados de adenosina permitem que ela seja transportada para o meio extracelular, exercendo seu efeito anti-inflamatório, principalmente por estimular a produção de células T reguladoras (Tregs), uma subpopulação de células T conhecida por controlar a resposta imune. Entretanto, cerca de 40% dos pacientes tratados com MTX não respondem à terapia (Peres et al., 2018).

Aos pacientes não respondedores, como alternativa terapêutica, deve-se agregar ao tratamento os imunobiológicos. Dentre os mais utilizados estão aqueles direcionados ao controle do efeito de citocinas pró-inflamatórias, como o infliximab e o tocilizumab, anticorpos monoclonais que bloqueiam o fator de necrose tumoral (TNF)- α (Criscione & Clair, 2002) e o receptor da interleucina (IL) 6 (Narazaki, 2017), respectivamente. Além dos custos elevados, é necessário mencionar que os efeitos adversos também contribuem para a interrupção do tratamento (Swierkot et al., 2014). Sendo assim, faz-se importante o estudo de novos mecanismos envolvidos com a inflamação na AR visando, assim, a identificação de novos alvos terapêuticos.

1.2. Modelo experimental de artrite reumatoide – Artrite Induzida por Antígeno (AIA)

Os roedores são amplamente utilizados em modelos de artrite devido à facilidade de manuseio, relativo baixo custo e homogeneidade. Existem vários modelos de indução de artrite, porém nenhum deles pode reproduzir completamente a doença. Sendo assim, é importante utilizar um modelo com menor desigualdade e adequado ao estudo em questão (Choudhary et al., 2018).

Dentre os diversos modelos experimentais de AR, temos o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), o qual consiste, basicamente, na imunização do animal com um antígeno, como a albumina sérica bovina metilada (mBSA) seguida de um desafio intra-articular com esse mesmo antígeno, o que gera uma resposta imune e uma artrite limitada à articulação que recebeu o antígeno. É um modelo dependente de células da imunidade adaptativa e que possui achados histopatológicos semelhantes aos de AR em pacientes, como hiperplasia da sinóvia, infiltração na região perivascular, formação de *pannus* e erosões cartilaginosas (Brackertz et al., 1977).

O modelo de AIA foi o escolhido para o presente estudo porque além de possuir semelhanças com a doença em humanos, permite a avaliação do limiar nociceptivo dos animais (Ebbinghaus et al., 2017). É descrito que camundongos artríticos possuem hipernocicepção mecânica quando o mBSA é injetado na articulação tíbio-dorsal (Verri et al., 2008).

1.3. Dor articular

A dor é um dos cinco sinais cardinais da inflamação e tem papel fisiológico de proteção do organismo (Janeway et al., 2010). O organismo possui vários sistemas para o controle da homeostasia, e a dor é um deles, atuando como um mecanismo de alerta (Wall, 1999). Entretanto, também é o principal sintoma de inúmeras condições patológicas, como câncer, doenças inflamatórias e degenerativas, representando um problema de saúde pública com custo social elevado (van Hecke et al., 2013).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é classificada como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial ao tecido, ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 2012). A dor é dependente de dois componentes, a nocicepção e a percepção. A nocicepção resulta da detecção de estímulos capazes de comprometer a integridade física do organismo. Por sua vez, a percepção é dependente de condições psicológicas, emocionais e motivacionais, bem como das experiências de cada indivíduo. Em modelos animais, a dor é chamada de hipernocicepção, porque refere-se à redução do limiar nociceptivo, visto que não é possível saber a percepção dos mesmos. (Noback et al., 1996; Bas et al., 2016).

A percepção dos estímulos nocivos se dá através do sistema nervoso central (SNC). Na periferia, ocorre ativação dos nociceptores (neurônios sensoriais primários) mediante a presença de estímulos nociceptivos, os quais sensibilizam esses neurônios. Durante o processo inflamatório, ocorrem alterações no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP) que reduzem os limiares de dor. As articulações são inervadas por nociceptores, os quais encontram-se inativos em articulações saudáveis. Porém, quando ocorre lesão tecidual, como na AR, esses nociceptores são sensibilizados e tornam-se ativos. A partir dessa ativação, a informação nociceptiva é conduzida pelos neurônios primários que fazem sinapse com neurônios de segunda ordem localizados na medula, de onde o estímulo é levado até o córtex somatossensorial, local onde esse estímulo é percebido como dor (Schaible & Schmidt, 1988).

Existem mediadores nociceptivos que podem atuar direta e/ou indiretamente nos nociceptores. As prostaglandinas geradas a partir da enzima ciclooxigenase (COX) são mediadores responsáveis por atuar de maneira direta na

sensibilização desses neurônios. A citocina IL-1 β , também atua como um mediador nociceptivo indireto, estimulando o aumento da expressão de COX-2 e, conseqüentemente, de prostaglandinas. Ademais, a IL-1 β , estimula a liberação da quimiocina derivada de queratinócitos (KC), a qual estimula as aminas simpatomiméticas, as quais também podem sensibilizar os nociceptores (Cunha et al., 1992; Cunha et al., 2008).

O TNF- α é uma citocina importante durante a cascata de mediadores nociceptivos no contexto de dor articular, podendo atuar por duas vias paralelas. Uma dessas vias consiste na indução da IL-1 β , a qual atua aumentando a produção de prostaglandinas, como citado acima. A segunda via de atuação do TNF- α é sobre o aumento da produção de KC, que exercerá seus efeitos sobre as aminas simpatomiméticas (Cunha et al., 1992).

Durante o processo inflamatório ocorre a migração dos neutrófilos, um processo fundamental para a hipernocicepção articular. Em modelos de zimosan e carragenina, a inibição farmacológica da migração de neutrófilos com fucoidina (inibidor da adesão de leucócitos) é capaz de inibir a resposta hipernociceptiva em camundongos (Guerrero et al., 2008). Além disso, a hipernocicepção plantar induzida pelas citocinas citadas anteriormente, TNF- α e IL-1 β é inibida com a administração da fucoidina. Sendo assim, na ausência da migração neutrofílica essas citocinas não são capazes de induzir hipernocicepção, o que demonstra que os neutrófilos são importantes na gênese desses mediadores (Cunha et al., 2008)

A dor articular é um dos sintomas mais característicos de pacientes artríticos, sendo sua melhora prioridade para a maioria dos pacientes em tratamento (Klooster et al., 2007). Comumente, a dor articular na AR é tratada com o uso dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Os AINEs são responsáveis

pela inibição das prostaglandinas, mediadores nociceptivos, através da inibição da enzima (COX), a qual possui três isoformas, sendo a COX-1, considerada fisiológica e constitutiva e a COX-2 que é induzida por processos inflamatórios, as mais conhecidas. Uma das principais problemáticas da terapia com AINEs é o risco do surgimento de úlceras gástricas, devido à inibição da COX-1 por um tempo prolongado, visto que a AR é uma doença crônica e necessita de tratamento medicamentoso contínuo (Crofford, 2013; Rang et al., 2007). Atualmente, com a evolução do tratamento da AR surgiram os DMARDs, que apesar de serem eficazes em, muitas vezes controlar a doença e manter a sua atividade baixa, motivo pelo qual há sensação de redução da dor, em alguns pacientes não há essa redução, porque como já mencionado, existem muitos casos onde não há remissão da doença por ausência de resposta ao tratamento (Lee et al., 2014). Sendo assim, existe a necessidade de buscar-se novas alternativas terapêuticas para o controle da dor em pacientes com AR.

1.4. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos, também conhecidos como glóbulos brancos, mais abundantes encontrados na circulação, tendo um papel fundamental no contexto de imunidade inata (Silva & Correia-Neves, 2012). São considerados fagócitos de primeira linha, tendo um alto poder citotóxico devido à fatores como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de grânulos (Nathan & Shiloh, 2000). Adicionalmente, os neutrófilos são capazes de liberar a enzima MPO, envolvida nos mecanismos oxidativos contra microorganismos realizados por estas células (Klebanoff, 2005).

Seu desenvolvimento ocorre na medula óssea e são liberados na circulação (Borregaard, 2010), onde têm vida curta, sofrendo apoptose rapidamente. Entretanto, durante processos infecciosos, os neutrófilos são recrutados a partir de sinais dados por citocinas e quimiocinas e saem da circulação em direção ao sítio inflamatório, onde se ativam e podem liberar seus grânulos, processo conhecido como degranulação (Mantovani et al., 2011). Essa migração em direção aos tecidos inflamados faz com que os neutrófilos sofram mudanças de função e de longevidade, através do aumento da expressão de proteínas capazes de controlar a apoptose, o que leva a um consequente aumento de sua vida útil (Cassatela, 1999; Mantovani et al., 2011).

Além de serem atraídos em direção aos tecidos e se ativarem mediante infecções causadas por microorganismos, essa migração também ocorre em doenças inflamatórias, onde existe uma desregulação da apoptose de neutrófilos, fazendo com que assim a vida destas células seja prolongada, o que leva, consequentemente, a um aumento da produção de citocinas, enzimas e EROs, perdurando a inflamação (Wright et al., 2014).

Hoje sabe-se que estas células possuem papel ativo e importante no processo de AR. Neutrófilos de pacientes artríticos são funcionalmente diferentes dos de indivíduos saudáveis, expressando, por exemplo, altos níveis de TNF de membrana (Wright et al., 2011). Além disso, a MPO, que possui alto caráter citotóxico, apresenta atividade anormal em doenças autoimunes, sendo encontrada em níveis elevados tanto no plasma como na sinóvia de pacientes (Fernandes et al., 2012). Outra enzima com papel importante é a elastase de neutrófilos (NE), uma serina-protease que ativa receptores que levam a uma resposta inflamatória e

contribuem para o processo de destruição da cartilagem (Watanabe et al., 1990; Busso et al., 2007).

1.5. *Neutrophil Extracellular Traps*

Outro mecanismo de defesa dos neutrófilos descoberto em 2004 é o de formação das *neutrophil extracellular traps* (NETs). Os neutrófilos ativados liberam sua cromatina (DNA+histonas) juntamente a grânulos e enzimas, como a MPO e elastase, que formam uma estrutura semelhante a uma malha, a qual atua como uma armadilha que pode levar à morte de patógenos extracelulares (Brinkmann et al., 2004). A enzima peptidilarginina deiminase 4 (PADI-4) expressa em granulócitos, como os neutrófilos, é essencial para a formação das NETs. A ativação da PADI-4 ocorre por mecanismo dependente do aumento do influxo de cálcio intracelular. Essa enzima leva à citrulinização de histonas presentes na cromatina, causando sua descondensação, o que facilita a extrusão de parte do DNA cromossômico que será liberado associado a moléculas antimicrobianas, como a MPO, a elastase e a catepsina G (Rohrbach et al., 2012). Assim, a formação de NETs pode ser inibida, experimentalmente, através da inibição farmacológica ou deleção genética da PADI-4 (Li et al., 2010). Além disso, a degradação de NETs previamente formadas pode ser obtida com a utilização de DNases (Sperling et al., 2017).

Foi descrito que a liberação das NETs, processo conhecido por netose, consiste em um tipo de morte neutrofílica distinta da apoptose e da necrose (Fuchs et al., 2007). A apoptose é um tipo de morte celular natural e programada geneticamente. Neutrófilos submetidos à apoptose apresentam alterações

morfológicas, como o desacoplamento do citoesqueleto da membrana plasmática, o qual causa uma protusão na membrana plasmática da célula, condensação da cromatina, corte do DNA por endonucleases, encolhimento do corpo celular e densificação do citoplasma (Dabrowska et al., 2018). Por outro lado, a necrose é caracterizada como um processo passivo que ocorre pela influência de fatores físicos como temperatura, fatores químicos e biológicos (Syntichaki & Tavernarakis, 2002). Ocorre um desequilíbrio osmótico, levando a despolarização da membrana mitocondrial e um transporte inadequado de íons, causando assim uma inibição do metabolismo celular e diminuição de ATP (Trump & Berezsky, 1995; Trump et al., 1997).

Dentre os estímulos que levam à produção de NETs *in vitro*, temos, por exemplo, o acetato miristato de forbol (PMA), o lipopolissacarídeo (LPS) e a IL-8 (Brinkmann et al., 2004), bem como microorganismos e seus constituintes. Além da IL-8, outros mediadores inflamatórios, como exemplo o TNF e o interferon (IFN), também são descritos por induzir a formação de NETs através da ativação da PADI-4 (Branzk & Papayannopoulos, 2013; Cooper et al., 2013).

Além do seu papel microbicida, as NETs parecem estar envolvidas com outros mecanismos. O seu bloqueio é capaz de reduzir o dano tecidual em camundongos submetidos a doenças infecciosas, o que sugere que as NETs podem induzir dano ao tecido do hospedeiro (Kolaczowska et al., 2015). Ademais, proteínas expostas ao meio extracelular durante o processo de netose resultam numa potencial apresentação de autoantígenos e na liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Jorch & Kubes, 2017), o que torna a liberação de NETs um fator que pode estar envolvido com a autoimunidade. Além disso, sabe-se que pacientes com AR possuem aumento de NETs quando

comparados a indivíduos saudáveis, e que essas NETs podem estar envolvidas com processos lesivos (Chowdhury et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que as NETs estão envolvidas com processos lesivos em doenças autoimunes como a AR, e que os neutrófilos têm um papel fundamental na hipernocicepção através, principalmente, da liberação de mediadores nociceptivos nas articulações. Portanto, é importante estudar se a liberação de NETs por esses neutrófilos possui um papel nessa hipernocicepção.

3.OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o papel das NETs na dor articular em modelo experimental de artrite reumatoide e em pacientes artríticos.

Objetivos específicos

3.1.1. Investigar se as NETs têm participação no modelo de AIA;

3.1.2. Investigar se o bloqueio das NETs altera a doença experimental;

3.1.3. Investigar se as NETs causam dor articular;

3.1.4. Investigar os mecanismos pelos quais as NETs poderiam causar dor articular;

3.1.5. Investigar a relação entre o aumento de NETs e dor em pacientes com AR.

4. METODOLOGIA

4.1. Pacientes

Os pacientes com AR e osteoartrite (OA), além de indivíduos saudáveis voluntários foram provenientes do ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e os experimentos seguiram as normas de acordo com o Comitê de Ética de Experimentação Humana (Anexo 1). Foram coletados os sangues de pacientes com AR e de indivíduos controles para dosagem de NETs em neutrófilos periféricos isolados. Também foram coletados os líquidos sinoviais de pacientes com AR e OA para dosagem de NETs e feita análise de dor através da Escala Visual Analógica de Dor (EVA-D).

4.2. Escala Visual Analógica de Dor

É uma escala que marca a dor de 0 a 100 mm. As pontuações menores de 34 indicam “dor leve”, pontuações entre 35 e 67 indicam “dor moderada” e maiores que 67 indicam “dor grave”. Essa pontuação é dada de acordo com as respostas dos pacientes (Bird & Dickson, 2001).

4.3. Isolamento de neutrófilos periféricos

Após a coleta dos sangues dos pacientes e dos indivíduos controles no ambulatório de reumatologia, os tubos contendo citrato foram centrifugados a 450G, 4°C, por 10 minutos. Os plasmas foram separados e a partir do restante dos sangues foram feitos os isolamentos dos neutrófilos através da montagem de gradiente de Percoll. Em falcons de 15 mL foram montados quatro gradientes com diferentes densidades (72%, 63%, 54% e 45%) com 2 mL de cada, do mais concentrado para o menos concentrado, totalizando 8 mL em cada falcon. Após, os sangues foram depositados sobre os gradientes até um volume de onze mL. Os falcons foram centrifugados a 650G, 24°C, aceleração e desaceleração 1, por 30 minutos. Após essa centrifugação, os neutrófilos foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta Pasteur na última nuvem celular formada em cada falcon. As foram lavadas com solução balanceada de Hank's (HBSS) a 450G, 24°C, por 10 minutos. Após essa lavagem as hemácias remanescentes foram lisadas com tampão de lise a 450G, 24°C, por 10 minutos, e os neutrófilos foram ressuspensos em HBSS com albumina sérica bovina (BSA) a 2% e contados em câmara de Neubauer para contagem total de células. Além disso, foi realizada contagem diferencial em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com panótico. Foram plaqueados 1×10^6 neutrófilos em placa de 48 poços e incubados por 4 horas em estufa de CO₂ e armazenados em freezer -20°C para posterior dosagem de NETs.

4.4. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57/Bl6, de linhagem isogênica selvagem, provenientes do Biotério Central do Departamento de Farmacologia da

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), camundongos *knockouts* para TLR-4 e TNFR1 provenientes do Centro de Criação de Animais Especiais da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Foram utilizados de cinco a seis animais por grupo experimental, os quais permaneceram cerca de dois dias no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos, seguindo todos os protocolos de acordo com as diretrizes éticas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP (241/2018) (Anexo 2).

4.5. Preparo de soluções, drogas e reagentes

- Gradientes de Percoll

Percoll fisiológico 1:

Percoll (GE Healthcare).....90 mL

HBSS 10x sem fenol (Thermo Fisher).....10 mL

Percoll fisiológico 2:

Percoll (GE Healthcare).....90 mL

HBSS 10x com fenol (Thermo Fisher).....10 mL

Preparo dos gradientes para isolamento de neutrófilos do sangue periférico humano:

72%: 36 mL de Percoll fisiológico 1 + 14 mL de HBSS 1x

63%: 31,5 mL de Percoll fisiológico 2 + 18,5 mL de HBSS 1x

54%: 27 mL de Percoll fisiológico 1 + 23 mL de HBSS 1x

45%: 22,5 mL de Percoll fisiológico 2 + 27,5 mL de HBSS 1x

Preparo dos gradientes para isolamento de neutrófilos da medula óssea de camundongos:

72%: 36 mL de Percoll fisiológico 1 + 14 mL de HBSS 1x

65%: 32,5 mL de Percoll fisiológico 2 + 17,5 mL de HBSS 1x

O pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) e as soluções foram armazenadas a 4°C antes de serem utilizadas.

- Líquido de Turkey

Ácido Acético Glacial P.A (Merck).....9 mL

Azul de Metileno (Merck).....1mL

Água Milli-Q q.s.p1 L

- Corante panótico rápido (LaborClin)

Panótico rápido nº 1: solução de triarilmetano 0,1%.

Panótico rápido nº 2: solução de xantenos 0,1%.

Panótico rápido nº 3: solução de tiazinas 0,1%

- Tampão de salina-fostato (PBS)

Cloreto de Sódio P.A (NaCl, Merck).....8,0 g

Cloreto de Potássio P.A (KCl, Merck).....0,2 g

Fosfato de Sódio dibásico P.A (Na₂HPO₄, Merck).....1,15 g

Fosfato de Potássio monobásico P.A (KH₂PO₄, Merck).....0,2 g

Água Milli-Q q.s.p1L

O pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) e a solução foi armazenada a 4°C antes de ser utilizada.

- Albumina bovina sérica metilada (mBSA)

Este reagente foi pesado e diluído em adjuvante completo de Freund (CFA) antes de ser utilizado.

- Drogas

A tabela a seguir (Tabela 1), descreve todas as drogas e os veículos utilizados no presente trabalho:

Droga	Veículo
Pulmozyme (Roche)	-
Zimosan (Sigma-Aldrich)	Salina 0,9%
Indometacina (Prodome)	Tampão Tris 0,1M, pH 8,0

Tabela 1. Drogas e veículos utilizados nos protocolos experimentais.

4.6. Artrite induzida por antígeno (AIA)

Os animais C57/Bl6 foram anestesiados com isoflurano 1,5% (via inalatória) previamente aos procedimentos, seguindo as normas estabelecidas pela CEUA da FMRP. No dia 0 os animais foram imunizados por via subcutânea com uma emulsão composta de mBSA, NaCl 0,9% e CFA. No 7º dia foi realizada uma nova imunização seguindo o mesmo protocolo. No 21º dia os animais AIA foram desafiados com mBSA em NaCl 0,9% ou somente NaCl 0,9% (animais controles)

por via intra-articular em um ou dois joelhos. No vigésimo sexto dia o desafio foi repetido. O grupo de animais AIA tratados com Pulmozyme recebeu o tratamento por via intra-articular 1 hora antes e 1 hora após o segundo desafio com mBSA. A avaliação do edema foi feita com o auxílio de um paquímetro no dia 0 e 24 horas após o segundo desafio com mBSA. Os lavados articulares para contagem de neutrófilos e dosagem de NETs foram feitos com 10 μ L de PBS com o auxílio de uma micropipeta. Os sangues desses animais foram coletados para a dosagem de NETs nos plasmas e os neutrófilos foram isolados das medulas também para quantificação de NETs em animais AIA e controles (figura 1).

Figura 1. Protocolo experimental do modelo de AIA.

4.7. Purificação e injeção de NET intra-articular

Os neutrófilos das medulas de camundongos selvagens foram isolados a partir de gradiente de Percoll com as concentrações de 72% e 65%. Foram plaqueados 10^6 neutrófilos por poço em placa de 48 poços estimulados com 2

nanogramas (ng) de PMA. Após 4 horas em estufa de CO₂ o sobrenadante foi coletado e o fundo da placa lavado e aspirado cuidadosamente com PBS sem cálcio e sem magnésio (Sigma-Aldrich) gelado e passado para eppendorfs de 1,5 mL, centrifugados a 650G, 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e foi feita nova lavagem com o PBS gelado e uma centrifugação a 18.000 RPM, 4°C por 10 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram descartados e foi feita ressuspensão dos lisados, restando 100µL de lisado com PBS. Essa NET foi armazenada em freezer -20°C e dosada no NanoDrop e por meio de ensaio de fluorescência em placa sensibilizada com anticorpo anti-MPO (Invitrogen, PAS-16672) e com PicoGreen (Invitrogen). Posteriormente, essa NET purificada foi injetada nas concentrações de 5, 10 e 20 ng nas articulações dos joelhos direitos de animais selvagens, TLR-4 ^{-/-} ou TNFR1 ^{-/-}, e após 3, 6 e 24 horas foram avaliados os limiares mecânicos/edema/coleta das articulações para dosagem de citocinas pró-inflamatórias por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

4.8. Contagem de neutrófilos

Após a coleta dos lavados articulares foram feitas as contagens dos números totais de leucócitos destes lavados com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico (aumento de 400x). As contagens diferenciais foram feitas após centrifugação no Cytospin e coloração com hemotoxilina e eosina.

4.9. Dosagens de NETs

As dosagens de NETs foram feitas a partir dos lavados articulares dos animais. 24 após o segundo desafio intra-articular nos dois joelhos foram feitas as coletas dos lavados articulares com PBS auxiliado por uma micropipeta. Os lavados dos dois joelhos foram centrifugados a 10.000 G, 4°C por 10 minutos e os sobrenadantes foram coletados para as dosagens de NETs. Em uma placa de fluorescência foi plaqueado anticorpo anti-MPO (Invitrogen®) e esta placa foi armazenada a 4°C *overnight*. No segundo dia foram acrescentadas as amostras dos lavados, neutrófilos isolados e dos plasmas, e no terceiro dia foram feitas as quantificações de NETs através do kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen®) que quantificou DNA associado a enzima MPO. Também foram dosadas NETs nos neutrófilos isolados e líquidos sinoviais de pacientes seguindo o mesmo protocolo.

4.10. Histologias

24 horas após o segundo desafio com mBSA, as articulações dos animais controles, AIA e AIA tratados com Pulmozyme foram coletadas em paraformaldeído (PFA) 4% e após 24 horas permaneceram descalcificando em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) durante 21 dias para serem feitos cortes histológicos em lâminas de histologia com parafina. Foram feitas colorações nas lâminas com os cortes para avaliação da estrutura articular com hematoxilina e eosina.

4.11. Determinação farmacológica dos mediadores inflamatórios envolvidos na hiperalgesia causada pelas NETs

Para determinar os mediadores envolvidos no processo de hiperlgesia induzida pelas NETs, foram utilizados animais deficientes para o receptor do tipo I do TNF- α e para o TLR-4. Além disso, foram utilizadas drogas como a indometacina, um inibidor das ciclooxigenases, e o Pulmozyme, uma DNase. Na tabela abaixo são descritos os protocolos farmacológicos de pré-tratamentos de acordo com as drogas, os tempos, as doses e as vias de administração (Tabela 2).

Droga	Tempo	Dose/via	Referência
Indometacina	30 minutos antes da injeção de NETs	5 mg/kg; i.p	Cunha et al., 2005
Pulmozyme	Co-tratamento	0,1 mg/kg; i.a	-

Tabela 2. Pré-tratamentos de acordo com as drogas, o tempo, a dosagem e a via.

4.12. Avaliação da hipernocicepção mecânica articular

Antes das avaliações nociceptivas mecânicas, os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 45-60 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente. A hiperalgesia foi avaliada através do von Frey eletrônico aplicado na região medial da pata posterior direita. A resposta nociceptiva é caracterizada por flexão seguida de súbita retirada da pata e foi apresentada como limiar mecânico (g).

4.13. ELISA

As articulações dos animais foram coletadas e maceradas em PBS contendo inibidor de protease e centrifugadas a 1500 RPM, a 4°C por 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -80°C. Foram dosados os seguintes mediadores: IL-1 β 6 horas após injeção de NETs i.a, TNF- α 2 horas após injeção de NETs i.a, e KC/CXCL1 6 horas após a injeção de NETs i.a, os quais foram quantificados através do uso de KITS comerciais de ELISA (R&D System®).

4.14. qPCR

As expressões de RNAm para PAD₄ e COX-2 foram avaliadas por PCR em tempo real. Foi feita extração do RNA total dos lavado articulares dos animais NAIVE e AIA, e de animais que receberam injeção de NETs i.a, utilizando kit de extração da Qiagen seguida de conversão para cDNA. A concentração de RNA foi determinada pela densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm através do aparelho GeneQuant (Amersham Biosciences Corp., Piscataway). O RNA foi transcrito para cDNA por ação da enzima transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A reação quantitativa do qPCR em tempo real foi feita no ABI Prism 7500 Sequence Detection System usando o sistema de fluorescência SYBRgreen (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. O qPCR foi executado com volume final da reação de 13 μ L e mantido sobre 95°C (10 min), e mais 40 ciclos de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min) e 72 °C (2 min). A curva de fusão foi analisada (65–95 °C) para verificar se

apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT). Os pares de primers (primer forward e primer reverse) murinos utilizados estão apresentados na Tabela 3.

Primer	Foward	Reverse
GAPDH	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	CCTTCCACAATGCCAAAGTT
PAD4	TGACCAATGGATGCAGGACG	CTCTGTCCCTCGGGGAGTC
COX-2	GTGGAAAAACCTCGTCCAGA	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG

Tabela 3. Sequências de primers murinos utilizados.

4.15. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) que foram então avaliados por meio de ANOVA one-way ou two-way seguido de Bonferroni ou teste t de Student, ou por teste t não paramétrico. O nível de significância foi considerado para valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism (GraphPad Software) versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1. Aumento de NETs nas articulações de animais artríticos está associado ao aumento da expressão gênica de Padi4 articular.

Inicialmente foi investigado se as NETs possuem participação no modelo de AIA. Para isso foram feitas coletas dos lavados articulares de camundongos artríticos e camundongos controles (que não receberam mBSA i.a) e a partir destes foram dosadas as NETs nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas após o segundo desafio com mBSA. Os resultados demonstraram que os animais AIA possuem um aumento de NETs nas articulações 24 horas após o segundo desafio com mBSA ($3,04 \pm 0,43$) (figura 2a). Além disso, esses animais possuem um aumento da expressão gênica de Padi4 articular 24 horas após o segundo desafio ($2,89 \pm 0,44$) (figura 2b).

Figura 2. Aumento de NETs e da expressão gênica de Padi4 no modelo de AIA. (a) Avaliação da concentração de NETs nas articulações 3, 6, 12 e 24 horas

após o segundo desafio com mBSA. **(b)** Expressão gênica de Padi4 articular 24 horas após o segundo desafio com mBSA. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5-6 animais. * $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo controle (CT).

5.2. Degradação de NETs causa uma melhora da doença experimental, com melhora da dor articular.

O próximo passo foi avaliar se uma redução das NETs no modelo de AIA causaria alguma alteração na doença experimental. Para isso os animais artríticos foram tratados com o Pulmozyme, uma DNase utilizada experimentalmente para degradar as NETs, 1 hora antes e 1 hora após o segundo desafio com mBSA, e após 24 horas foi feita a coleta do lavado articular. Os animais AIA tratados com Pulmozyme têm uma redução da concentração de NETs nas articulações em relação aos animais AIA não tratados ($0,44 \pm 0,30$) (figura 3a). Apesar disso, a quantidade de neutrófilos nas articulações não sofre alterações significativas nos animais AIA tratados com Pulmozyme quando comparados aos AIA não tratados ($4,85 \pm 0,47$) (figura 3b). Entretanto, o edema e os parâmetros hiperplasia da sinóvia, infiltrado celular, avaliados a partir do escore histopatológico, encontram-se reduzidos nos animais AIA tratados com Pulmozyme quando comparados aos AIA não tratados ($0,25 \pm 0,05$) (figura 3c) ($4,00 \pm 0,45$) (figura 3d), respectivamente. Além disso, foi avaliada a hipernocicepção mecânica nesses animais através do Von Frey eletrônico, e como esperado os animais AIA possuem uma queda do limiar mecânico em relação aos animais controle ($4,12 \pm 1,14$) e o tratamento com Pulmozyme reverte a queda desse limiar em relação aos animais artríticos não tratados ($5,54 \pm 0,65$) (figura 3e).

Figura 3. Efeito da degradação das NETs na doença experimental (a) Avaliação do tratamento por via i.a com Pulmozyme em camundongos artríticos na concentração de NETs articular. (b) Quantificação de neutrófilos nas articulações de animais tratados por via i.a com Pulmozyme. (c) Medida do edema em animais artríticos tratados com Pulmozyme. (d) Escore histopatológico de animais artríticos tratado com Pulmozyme. (e) Avaliação da hipernocicepção mecânica por Von Frey eletrônico 3, 6 e 24 horas após o segundo desafio com mBSA de animais artríticos tratados com Pulmozyme. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5-6 animais. * $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo

controle (CT); # $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo artrítico (AIA).

5.3. NETs causam hipernocicepção articular.

Devido à degradação das NETs levar à uma redução da hipernocicepção em animais AIA tratados com Pulmozyme, o passo seguinte foi investigar se as NETs são capazes de causar hipernocicepção mecânica quando administradas por via i.a. Sendo assim, os animais foram tratados por via i.a com salina (controle negativo), com zimosan (controle positivo, causa hipernocicepção articular), e com três diferentes doses de NET purificada (5, 10 e 20 ng) e após 3, 6 e 24 horas foram feitas as avaliações dos limiares mecânicos. De acordo com o resultado, temos que as três doses causam queda do limiar mecânico quando comparadas ao controle negativo, a salina. Entretanto, foi escolhida a dose de 10 ng, por ter causada maior queda do limiar mecânico, e por ser uma dose menor que a de 20 ng ($3,98 \pm 0,96$) (figura 4a). A seguir, essa NET foi tratada com Pulmozyme *in vitro* e foi injetada por via i.a. É possível observar que com a degradação dessa NET ocorre reversão da queda do limiar mecânico em relação aos animais tratados apenas com a NET 10 ng ($5,22 \pm 0,50$) (figura 4b). Além disso, a injeção de NET é capaz de aumentar o edema em relação aos animais controle (salina) ($0,47 \pm 0,03$), e que o tratamento dessa NET com o Pulmozyme reduz esse edema ($0,23 \pm 0,03$) (figura 4c). Ademais, visto que o TNF- α é uma citocina importante na cascata de hipernocicepção, avaliamos a importância dessa citocina com a injeção de NETs. Animais deficientes para o TNFR1 têm menor redução do limiar mecânico ao receberem injeção de NET quando comparados aos animais selvagens que possuem o receptor ($5,41 \pm 0,38$) (figura 4d) e de fato, existe um aumento da concentração articular de

TNF- α nesses animais tratados com NETs ($1,35 \pm 0,23$) (figura 4e). Também foram quantificadas as concentrações de IL-1 β e de KC nas articulações dos animais que receberam NET i.a, e o que pode-se observar é que existe um aumento dessas citocinas pró-inflamatórias em relação aos animais controles ($109,50 \pm 11,49$) ($366,10 \pm 46,58$), respectivamente (figuras 4f e 4g).

Figura 4. Efeito da injeção de NETs nas articulações. (a) Avaliação da hipernocicepção mecânica 3, 6 e 24 horas após injeções de três diferentes doses de NETs (5, 10 e 20 ng). (b) Avaliação da hipernocicepção mecânica 3, 6 e 24 horas após injeção de NET tratada com Pulmozyme. (c) Avaliação do edema 24 horas após injeção de 10 ng de NET e tratamento concomitante com Pulmozyme. (d) Avaliação da hipernocicepção mecânica 3, 6 e 24 horas após injeção de 10 ng de NET em animais TNFR1 $-/-$. (e) Dosagem de TNF- α nas articulações de animais tratados com NET i.a. (f) Dosagem de IL-1 β nas articulações de animais tratados com NET i.a. (g) Dosagem de KC nas articulações de animais tratados com NET i.a. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo NET.

5.4. NETs causam aumento da expressão gênica de COX-2.

A PGE₂ é um importante mediador nociceptivo, podendo ser liberada por células imunes como os neutrófilos. Sua síntese se dá a partir da enzima ciclooxigenase (COX)-2. Sendo assim, foram realizados experimentos para avaliar se a hipernocicepção articular causada pelas NETs tem envolvimento com a COX-2. Para isso, os animais que receberam NET por via i.a tiveram seus lavados articulares coletados 6 horas após esse desafio, porque 6 horas é o pico de dor nesses animais. A partir das células dos lavados foi feito um ensaio de qPCR para

avaliar a expressão gênica da COX-2. É possível observar que a injeção de NET na articulação causa um aumento dessa expressão em relação aos animais controles ($5,13 \pm 0,88$) (figura 5a). Além disso, os animais que receberam NET i.a foram tratados com indometacina, um inibidor não seletivo de COX, e após 6 horas é percebido que ocorre aumento do limiar mecânico quando compara-se com animais que receberam NET por via i.a, mas que não foram tratados ($6,12 \pm 0,16$) (figura 5b).

Figura 5. Efeito da injeção de NETs na expressão de COX-2 nas células do lavado articular. (a) Avaliação da expressão gênica de COX-2 6 horas após injeção i.a de NET. **(b)** Avaliação da hipernocicepção mecânica por Von Frey eletrônico 6 horas após injeção de NET e tratamento com indometacina via i.p. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo NET.

5.4. NETs causam hipernocicepção articular via TLR-4.

O passo seguinte foi identificar como as NETs causam hipernocicepção articular. Tendo em vista que o TLR-4 é um dos receptores reconhecedores de histonas, componentes das NETs, camundongos WT e TLR-4 $-/-$ foram tratados com NET por via i.a e a hipernocicepção mecânica e o edema foram avaliados. Os animais TLR-4 $-/-$ não demonstraram redução do limiar mecânico quando comparados aos animais WT ($6,03 \pm 0,16$) (figura 6a) e também redução do edema ($0,10 \pm 0,02$) (figura 6b).

a .

b .

Figura 6. Efeito da injeção de NETs nas articulações de camundongos TLR-4 $-/-$. (a) Avaliação da hipernocicepção mecânica 3, 6 e 24 horas após injeções de NET em camundongos TLR-4 $-/-$. (b) Avaliação do edema 24 horas após injeção de 10 ng de NET em camundongos TLR-4 $-/-$. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ indicam diferença significativa quando comparado ao grupo NET.

5.6. Pacientes com AR têm aumento das concentrações de NETs nos líquidos sinoviais.

Para transpor os dados encontrados em modelos animais para a clínica, foram dosadas as NETs nos líquidos sinoviais de pacientes com AR e com OA. O resultado demonstra que os pacientes com AR têm um aumento de NETs nas articulações em relação aos pacientes com osteoartrite ($209,60 \pm 47,46$) (figura 7).

Figura 7. Aumento de NETs nas articulações de pacientes com AR. Foram coletados os líquidos sinoviais de 38 pacientes com AR e 17 pacientes com osteoartrite (AO).

5.7. Neutrófilos de pacientes com AR são mais propensos a liberar NETs, as quais estão relacionadas com o aumento de dor.

Visto que os pacientes com AR têm aumento de NETs nas articulações, o passo seguinte foi analisar se os seus neutrófilos são mais propensos à liberarem NETs. Para isso foram coletados os sangues de pacientes com AR e de indivíduos saudáveis. A partir dos sangues, os neutrófilos periféricos foram isolados por gradiente de Percoll. As NETs foram então dosadas nesses neutrófilos isolados em

cultura. O resultado demonstra que os neutrófilos de pacientes com AR são mais propensos a liberarem NETs em relação aos neutrófilos periféricos de indivíduos saudáveis ($56,59 \pm 9,59$) (figura 8a). Ademais, foi analisada se existe correlação entre essas NETs e o escore clínico de dor (EVA) nesses pacientes com AR. De acordo com o resultado, temos que existe uma correlação positiva entre o aumento de NETs liberadas pelos neutrófilos e o aumento do escore de dor nos pacientes (figura 8b).

Figura 8. Aumento de NETs em neutrófilos isolados de pacientes com AR e correlação com escore de dor. (a) Foram coletados os neutrófilos de 26 pacientes com AR e de 13 indivíduos controles. **(b)** Correlação positiva entre as NETs liberadas pelos neutrófilos de pacientes com AR e o escore de dor nos mesmos (EVA).

6. DISCUSSÃO

A AR é a doença autoimune mais prevalente na população mundial, afetando a mortalidade e a qualidade de vida dos pacientes. Os homens têm uma redução de 4 anos na expectativa de vida, e essa diferença aumenta no caso das mulheres, que têm uma média de 10 anos a menos de expectativa de vida em relação às mulheres sem AR (Blumenauer et al., 2003; Haroon et al., 2007). Apesar do avanço na terapêutica, ainda há a necessidade pela busca de novas alternativas, visto que os medicamentos mais utilizados, MTX e infliximab, apresentam problemas quanto à responsividade (Romão et al., 2013). Nos últimos anos, foi demonstrado um aumento das NETs em amostras de pacientes com AR, possibilitando a descoberta de um novo biomarcador e também de um novo alvo terapêutico (Khandpur et al., 2013; Sur Chowdhury et al., 2014).

Um dos modelos mais utilizados para o estudo da AR é o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), que permite avaliar alguns parâmetros semelhantes à doença, como a formação de edema, migração de neutrófilos nas articulações, alterações histopatológicas (hiperplasia sinovial, infiltrado celular), aumento de citocinas pró-inflamatórias e hipernocicepção articular (Meyer et al., 2010; Zhang et al., 2018; Costa et al., 2015). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, temos que o modelo de AIA também é capaz de causar um aumento da concentração articular de NETs, citadas anteriormente como importantes na patogênese. Em outro modelo de AR, o de artrite induzida por colágeno (CIA), também foi demonstrado que ocorre um aumento de NETs liberadas por neutrófilos da medula. Além disso, animais CIA tratados com inibidor da PADI-4, a Cl-amidina, demonstraram redução dos sintomas da doença (Papadaki et al., 2016).

Atualmente sabe-se que a PADI-4 é importante para a produção de NETs (Knight et al., 2013), e no presente estudo os animais AIA possuem um aumento da sua expressão gênica, corroborando com o resultado de aumento de NETs.

Assim como a inibição da enzima PADI-4 leva à uma melhora de animais artríticos demonstrada por Papadaki e colaboradores, a degradação de NETs previamente formadas também é capaz de levar à uma melhora da doença experimental. O Pulmozyme, uma Dnase I exógena, é capaz de degradar NETs (Peña-Martínez et al., 2019), como pode ser demonstrado em animais AIA tratados por via i.a, os quais demonstraram redução da concentração de NETs nas articulações. Apesar disso, não há alteração significativa quanto à quantidade de neutrófilos nas articulações, demonstrando que os neutrófilos migram para a região, porém as NETs são degradadas e não exercerão seus efeitos. Visto isso, com essa redução das NETs previamente formadas, os resultados demonstraram que houve uma redução do edema nos animais artríticos tratados com o Pulmozyme. Como descrito acima, a formação do inchaço articular é um dos sintomas no modelo de AIA, e muitas vezes é associado à migração neutrofílica (Guazelli et al., 2018). Além disso, o modelo é conhecido por levar à uma piora do escore histopatológico (Gou et al., 2018; Zhuang et al., 2017) e os nossos resultados demonstram que uma redução da concentração de NETs é capaz de melhorar esse escore. Bem como ocorre uma melhora na hipernocicepção articular, um parâmetro clássico do modelo em questão (Pinto et al., 2015). Esses resultados demonstram que esses sintomas podem, em parte, ser desencadeados não somente pela presença dos neutrófilos, mas pelo processo de netose.

Durante o processo inflamatório, células do sistema imune, como os neutrófilos, principalmente, migram em direção ao tecido inflamado e medeiam a

liberação de moléculas hiperalgésicas (Cook et al., 2018). Os neutrófilos participam do desenvolvimento da hipernocicepção articular e também do aumento da permeabilidade vascular que forma o edema (Pinto et al., 2010; Moncada et al., 1973). No nosso estudo, observamos que as NETs liberadas por neutrófilos são capazes de causar hipernocicepção quando injetadas na cápsula articular de camundongos selvagens, sendo a primeira vez onde é demonstrada a capacidade dessas redes causarem dor. Além disso, também são capazes de provocar formação de edema, efeitos semelhantes aos encontrados ao administrar-se o zimosan, um polissacarídeo derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja administração em tecidos causa intensa reação inflamatória (Pinto et al., 2013; Schneider et al., 2019). Assim como em animais AIA tratados com Pulmozyme onde houve aumento do limiar mecânico, o tratamento *in vitro* das NETs com Pulmozyme levou ao aumento desse limiar, reduzindo assim a hipernocicepção articular, bem como a formação do edema.

Algumas citocinas estão intimamente relacionadas com a dor articular, podendo atuar diretamente nos neurônios nociceptivos, ou indiretamente, através da produção de mediadores inflamatórios que podem levar à sensibilização desses neurônios. O TNF- α , principal citocina pró-inflamatória na AR, consegue atuar diretamente nos neurônios, e sua injeção local é capaz de induzir hipernocicepção articular. Além disso, em animais AIA tratados com etarnecept, um anticorpo monoclonal que inibe a ação do TNF- α , tem-se uma redução da hipernocicepção. Nossos resultados demonstram que existe um aumento da concentração articular em animais que recebem NETs por via i.a, e que a injeção concomitante com o Pulmozyme reduz os níveis dessa citocina. Ademais, camundongos TNFR1 -/- que receberam NETs por via i.a têm menor queda do limiar mecânico quando

comparados aos animais selvagens, demonstrando que as NETs levam à um aumento dessa importante citocina. Outra citocina que tem aumento demonstrado no presente estudo a partir da injeção de NETs é a IL-1 β , expressa abundantemente na AR (McInnes & Schett, 2011) e apesar de ser capaz de sensibilizar fibras nociceptivas, sua neutralização não demonstra reduzir a hipernocicepção mecânica no modelo de AIA (Ebbinghaus et al., 2012). A quimiocina KC, a qual tem aumento demonstrado após injeção articular de NETs, também encontra-se envolvida com a AR (Wigerblad et al., 2016) e com a hipernocicepção mecânica (Cunha et al., 2005). Esses resultados apresentados de aumento de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à hipernocicepção, corroboram para a demonstração de que as NETs são capazes de causar dor articular.

A PGE₂ é um mediador fundamental envolvido com a sensibilização de fibras nociceptivas. Em 2008, Cunha e colaboradores demonstraram que o tratamento com fucoidina, o qual inibe a migração de neutrófilos, inibiu a produção de PGE₂ nas patas de ratos estimulados com IL-1 β , corroborando com achados na literatura que demonstram que os neutrófilos, ao serem estimulados por determinadas citocinas, levam à produção de PGE₂ (Conti et al., 1988; Akama et al., 1990). Nossos resultados indicam que o tratamento de camundongos com NETs por via i.a causa um aumento da expressão gênica de COX-2, podendo então, existir uma correlação com o aumento de PGE₂ causado por essas NETs, justificando a hipernocicepção articular nesses animais. Além disso, ao fazer uma abordagem farmacológica tratando esses animais que foram desafiados com a injeção de NETs, com indometacina, um inibidor não seletivo de COX, temos que ocorre reversão da queda do limiar mecânico, o que indica que esses animais

deixam de sentir dor, corroborando com a possibilidade dessa hipernocicepção ocorrer via COX-2/PGE₂.

Os TLRs têm um papel central na regulação da imunidade inata, e revelaram importância na potencialização de doenças autoimunes, como a AR (Elshabrawy et al., 2017). São considerados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que tem como ligantes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Abbas, 2012). Em 2017, Jorch e Kubes demonstraram que os constituintes das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) presentes no meio extracelular têm potencial antigênico e podem atuar como DAMPs. Em 2019, foi demonstrado que as histonas das NETs podem ser reconhecidas pelo TLR-4 em modelo de psoríase induzida por imiquimod (Shao et al., 2019). De acordo com os nossos resultados, temos que animais deficientes para o TLR-4 não respondem da mesma forma que animais selvagens à injeção articular de NETs. Na ausência desse receptor, os animais não apresentam queda no limiar mecânico, e também não apresentam aumento da formação do edema, o que demonstra uma possibilidade do TLR-4 estar envolvido com o reconhecimento dessas NETs e sua atuação sobre a hipernocicepção articular.

Os neutrófilos são as principais células presentes nos líquidos sinoviais de pacientes com AR. Estudos demonstram que existe um aumento de NETs nesses pacientes, tanto no soro quanto no líquido sinovial (Khandpur et al., 2013), assim como foi visto no nosso estudo, onde pacientes com AR têm aumento da concentração de NETs nos líquidos sinoviais quando comparados com pacientes com OA. Além disso, os neutrófilos de pacientes com AR são mais susceptíveis à produzirem NETs do que os neutrófilos de indivíduos saudáveis, resultado

semelhante ao encontrado por Chowdhury e colaboradores (Chowdhury et al., 2014), que também demonstraram que ao serem estimulados com PMA, esses neutrófilos liberam ainda mais NETs em comparação com os controles. Ademais, foi possível correlacionar esse aumento de NETs em neutrófilos isolados com o aumento de dor nesses pacientes com AR, demonstrando que pode haver uma importância clínica nessa relação entre NETs e dor.

7. CONCLUSÃO

- As NETs têm participação no modelo de AIA;
- A degradação das NETs causa uma redução dos sintomas da doença experimental;
- As NETs são capazes de causar dor articular;
- As NETs causam aumento da expressão gênica de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias;
- Existe correlação entre o aumento de NETs liberadas espontaneamente por neutrófilos de pacientes com AR e o aumento da dor nos mesmos.

8. REFERÊNCIAS

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. **Imunologia celular e molecular**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012.
2. Akama H, Ichikawa Y, Matsushita Y, Shinozawa T, Homma M. Mononuclear cells enhance prostaglandin E2 production of polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor α . **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 1990; 168, 857–862.
3. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis (in Eng). **Arth Rheum**, Feb 1995;38(2):151–160.
4. Baerwald C, Manger B, Hueber A. Depression as comorbidity of rheumatoid arthritis. **Z Rheumatol**, 2019 Apr;78(3):243-248.
5. Bas DB, Su J, Wigerblad G, Svensson CI. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. **Pain Manag**, 2016;6(3):265-84.
6. Blumenauer B, Cranney A, Clinch J, Tugwell P. Quality of life in patients with rheumatoid arthritis: which drugs might make a difference? **Pharmacoeconomics**, 2003; 21(13):927-40.
7. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheum**, 1977;20:841–850.
8. Branzk, N. & Papayannopoulos, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. **Semin. Immunopathol**, 35, 513–530 (2013).
9. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis (in Eng). **J Clin Invest**, 2008 Nov;118(11):3537-45.

10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
11. Busso N, Frasnelli M, Feifel R, Cenni B, Steinhoff M, Hamilton J, So A. Evaluation of protease-activated receptor 2 in murine models of arthritis. **Arthritis Rheum**, 2007 Jan;56(1):101-7.
12. Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv. Immunol**, 73, 369–509 (1999).
13. Choudhary N, Bhatt LK1, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 2018 Jun;40(3):193-200.
14. Chowdhury CS, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. **Arthritis Res Ther**, 2014; 16(3): R122.
15. Conti P, Reale M, Fiore S, Cancelli A, Angeletti PU, Dinarello CA. Recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor acting in synergy to release thromboxane, 6-KETO-PGF1 α and PGE2 by human neutrophils. **Scand. J. Rheumatol. Suppl**, 1988; 75, 318–324.
16. Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends Immunol**, 2018 Mar;39(3):240-255.

17. Cooper, P. R., Palmer, L. J. & Chapple, I. L. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? **Periodontol**, 2000 63, 165–197 (2013).
18. Costa VV, Amaral FA, Coelho FM, Queiroz-Junior CM, Malagoli BG, Gomes JH, Lopes F, Silveira KD, Sachs D, Fagundes CT, Tavares LD, Pinho V, Silva TA, Teixeira MM, Braga FC, Souza DG. Lithothamnion muelleri treatment ameliorates inflammatory and hypernociceptive responses in antigen-induced arthritis in mice. **PLoS One**, 2015 Mar 20;10(3):e0118356.
19. Criscione LG, St Clair EW. Tumor necrosis factor-alfa antagonists for the treatment of rheumatic diseases. **Curr Opin Rheumatol**, v.14, p.204-211, 2002.
20. Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. **Arthritis Res Ther**, 2013; 15(Suppl 3): S2.
21. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, 1992 Nov;107(3):660-4.
22. Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2005; 102: 1755-60.
23. Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, 2008 Apr;83(4):824-32.

24. Dąbrowska D, Jabłońska E1, Iwaniuk A1, Garley M. Many Ways-One Destination: Different Types of Neutrophils Death. **Int Rev Immunol**, 2018 Dec 5:1-15.
25. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. **Clin Genet**, 1989;36(3):178-82.
26. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Semin Immunopathol**, 2017 Jun;39(4):437-446.
27. DiMatteo MR, Lepper HS, Croghan TW. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. **Arch Intern Med**, 2000;160:2101–2107.
28. Ebbinghaus M, Natura G, Segond von Banchet G, Hensellek S, Böttcher M, Hoffmann B, Salah FS, Gajda M, Kamradt T, Schaible HG. Interleukin-17A is involved in mechanical hyperalgesia but not in the severity of murine antigen-induced arthritis. **Sci Rep**, 2017 Sep 4;7(1):10334.
29. Ebbinghaus M, Uhlig B, Richter F, von Banchet GS, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG. The role of interleukin-1 β in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, 2012 Dec; 64(12):3897-907.
30. Edwards RR, Cahalan C, Mensing G, Smith M, Haythornthwaite JA. Pain, catastrophizing, and depression in the rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, 2011;7:216–224.

31. Elshabrawy HA, Essani AE, Szekanecz Z, Fox DA, Shahrara S. TLRs, future potential therapeutic targets for RA. **Autoimmun Rev**, 2017 February; 16(2): 103–113.
32. Fernandes RM, da Silva NP, Sato EI. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, 2012 Jun;32(6):1605-9.
33. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, 2007 Jan 15;176(2):231-41.
34. Gou KJ, Zeng R, Ren XD, Dou QL, Yang QB, Dong Y, Qu Y. Anti-rheumatoid arthritis effects in adjuvant-induced arthritis in rats and molecular docking studies of Polygonum orientale L. extracts. **Immunol Lett**, 2018 Sep;201:59-69.
35. Guazelli CFS, Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Ruiz-Miyazawa KW, Vicentini FTMC, Vignoli JA, Camilios-Neto D, Georgetti SR, Baracat MM, Casagrande R, Verri WA Jr. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomed Pharmacother**, 2018 Jun;102:175-184.
36. Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Schivo IR, Dal-Secco D, Canetti C, Rocha FA, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. **J Leukoc Biol**, 2008; 83: 122-30.
37. Haroon N, Aggarwal A, Lawrence A, Agarwal V, Misra R. Impact of rheumatoid arthritis on quality of life. **Mod Rheumatol**, 2007; 17(4):290-5.
38. Janeway C, Travers P, Walport M, Murphy, K. **Imunobiologia de Janeway**, v.7. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.10-11.

39. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nat Med**, 2017; 7; 23(3):279-287.
40. Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study. **PLoS One**, 2018; 13(2):e0192365.
41. Kennedy A, Ng CT, Biniecka M, Saber T, Taylor C, O'Sullivan J, Veale DJ, Fearon U. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum**, 2010;62(3):711-21.
42. Khalifa O, Pers YM, Ferreira R., Sénéchal A, Jorgensen C, Apparailly F, Duroux-Richard I. X-Linked miRNAs Associated with Gender Differences in Rheumatoid Arthritis. **Int J Mol Sci**, 2016; 17(11): 1852.
43. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci Transl Med**, 2013 Mar 27;5(178):178ra40.
44. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, 2005 May;77(5):598-625.
45. Klooster ten PM, Veehof MM, Taal E, van Riel PLCM, van de Laar MAFJ. Changes in priorities for improvement in patients with rheumatoid arthritis during 1 year of anti-tumour necrosis factor treatment. **Ann. Rheum. Dis**, 66(11), 1485–1490 (2007).

46. Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Hodgins JB, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. **J Clin Invest**, 2013;123:2981–2993.
47. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG, Thanabalasuriar A, Lee WY, Sanz MJ, Mowen K, Opdenakker G, Kubes P. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. **Nat Commun**, 2015; 26;6:6673.
48. Lee YC, Frits ML, Iannaccone CK, Weinblatt ME, Shadick NA, Williams DA, Cui J. Subgrouping of patients with rheumatoid arthritis based on pain, fatigue, inflammation, and psychosocial factors. **Arthritis Rheumatol**, 2014 Aug;66(8):2006-14.
49. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **J Exp Med**, 2010 Aug 30; 207(9): 1853–1862.
50. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol**, 11, 519–531 (2011).
51. McDougall, JJ. Arthritis and Pain. Neurogenic origin of joint pain. **Arthritis Res Ther**, 2006; 8(6): 220.
52. McInnes IB, G. Schett, The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, 2011;365:2205-19.
53. Meyer DM, Jesson MI, Li X, Elrick MM, Funckes-Shippy CL, Warner JD, Gross CJ, Dowty ME, Ramaiah SK, Hirsch JL, Saabye MJ, Barks JL, Kishore N, Morris

DL. Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis. **J Inflamm (Lond)**, 2010 Aug 11;7:41.

54. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature**, 1973; 246, 217– 219.

55. Narazaki M, Tanaka T, Kishimoto T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. **Expert Rev Clin Immunol**, 2017 Jun;13(6):535-551.

56. Nathan, C., Shiloh, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000 Aug 1;97(16):8841-8.

57. Noback CR, Strominger NL, Dmarest RJ. **The human nervous system: structure and function**. Pain and temperature, 5aed., Williams & Wilkins, New York, 1996: 123-137.

58. Ostensen, M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann N Y Acad Sci**, 1999;876:131-43.

59. Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, Vlachou K, Drakos E, Bertias G, Ritis K, Boumpas DT, Thompson PR, Verginis P, Sidiropoulos P. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. **Eur J Immunol**, 2016 Nov;46(11):2542-2554.

60. Peña-Martínez C, Durán-Laforet V, García-Culebras A, Ostos F, Hernández-Jiménez M, Bravo-Ferrer I, Pérez-Ruiz A, Ballenilla F, Díaz-Guzmán J, Pradillo JM, Lizasoain I, Moro MA. Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps

Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance. **Stroke**, 2019 Sep 17;STROKEAHA119026848.

61. Peres RS, Donate PB, Talbot J, Cecilio NT, Lobo PR, Machado CC, Lima KWA, Oliveira RD, Carregaro V, Nakaya HI, Cunha TM, Alves-Filho JC, Liew FY, Louzada-Junior P, Cunha FQ. TGF- β signalling defect is linked to low CD39 expression on regulatory T cells and methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. **J Autoimmun**, 2018; 90:49-58.

62. Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, 2010 Feb;148(2):247-56.

63. Pinto AC, Cordeiro Rde A, Sidrim JJ, Leite AK, Leite AC, Girão VC, Brilhante RS, Rocha MF, Cunha FQ, Rocha FA. Anti-inflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis. **Mycopathologia**, 2013 Apr;175(3-4):193-206.

64. Pinto LG, Talbot J, Peres RS, Franca RF, Ferreira SH, Ryffel B, Aves-Filho JC, Figueiredo F, Cunha TM, Cunha FQ. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. **Arthritis Res Ther**, 2015 Sep 2;17:235.

65. Radstake TR, Roelofs, MF, Jenniskens YM, Oppers-Walffreen, B, Van Riel, R. L, Barrera, P, Joosten, L. A, Van Der Berg, W. B. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. **Arth Rheum**, v.50, n.12, p.3856-3865, 2004.

66. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. **Farmacologia**. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
67. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA. Activation of PAD4 in NET formation. **Front Immunol**, 2012 Nov 29;3:360.
68. Romão VC, Canhão H, Fonseca JE. Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs? **BMC Med**, 2013; 11: 17.
69. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J Clin Invest**, 1989 Mar; 83(3): 865–875.
70. Schaible HG, Schmidt RF. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J Neurophysiol**, 1988;60:2180–2195.
71. Schneider AH, Kanashiro A, Dutra SGV, Souza RDN, Veras FP, Cunha FQ, Ulloa L, Mecawi AS, Reis LC, Malvar DDC. Estradiol replacement therapy regulates innate immune response in ovariectomized arthritic mice. **Int Immunopharmacol**, 2019 Jul;72:504-510.
72. Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, Qiao H, Cao T, Zhuang Y, Shen S, Zhang T, Qiao P, Li C, Gudjonsson JE, Wang G. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. **Front Immunol**, 2019 Apr 5;10:746.

73. Sperling C, Fischer M, Maitz MF, Werner C. Neutrophil extracellular trap formation upon exposure of hydrophobic materials to human whole blood causes thrombogenic reactions. **Biomater Sci**, 2017 Sep 26;5(10):1998-2008.
74. Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. **Cell Immunol**, 2017;317:1–8.
75. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. **Arthritis Res Ther**, 2014 Jun 13;16(3):R122.
76. Sullivan PW, Ghushchyan V, Huang XY, Globe DR. Influence of rheumatoid arthritis on employment, function, and productivity in a nationally representative sample in the United States. **J Rheumatol**, 2010; 37: 544-9.
77. Swierkot J, Bogunia-Kubik K, Nowak B, Bialowas K, Korman L, Gebura K, Kolossa K, Jeka S, Wiland P. Analysis of associations between polymorphisms within genes coding for tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors and responsiveness to TNF-alpha blockers in patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, 2015 Mar;82(2):94-9.
78. Syntichaki P, Tavernarakis N. Death by necrosis: uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? **EMBO Rep**, 2002;3(7):604–609.
79. Talbot J, Peres RS, Pinto LG, Oliveira RDR, Lima KA, Donate PB, Silva JR, Ryffel B, Cunha TM, Alves-Filho JC, Liew FY, Louzada-Junior P, de Queiroz Cunha F. Smoking-induced aggravation of experimental arthritis is dependent of aryl hydrocarbon receptor activation in Th17 cells. **Arthritis Res Ther**, 2018;20(1):119.

80. Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. **Faseb J**, 1995;9(2):219–228.
81. Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol Pathol**, 1997;25(1):82–88.
82. van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 2009 Aug;60(8):2232-41.
83. van Hecke O, Torrance N, Smith BH. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. **Br J Anaesth**, 2013 Jul;111(1):13-8.
84. van't Land H, Verdurmen J, Ten Have M, van Dorsselaer S, Beekman A, de Graaf R. The association between arthritis and psychiatric disorders; results from a longitudinal population-based study. **J Psychosom Res**, 2010 Feb;68(2):187-93.
85. Verri Jr WA, Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2008; 105: 2723-8.
86. Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. 4^a ed.: Churchill Livingstone; 1999: 59-103.

87. Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J Pharmacol Exp Ther**, 2004 Jun;309(3):869-78.
88. Wassenberg S, Rau R. Radiographic healing with sustained clinical remission in a patient with rheumatoid arthritis receiving methotrexate monotherapy. **Arthritis Rheum**, 2002 Oct;46(10):2804-7.
89. Watanabe H, Hattori S, Katsuda S, Nakanishi I, Nagai Y. Human neutrophil elastase: degradation of basement membrane components and immunolocalization in the tissue. **J Biochem**, 1990;108:753–9.
90. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, 2014 Oct;10(10):593-601.
91. Wigerblad G, Bas DB, Fernades-Cerqueira C, Krishnamurthy A, Nandakumar KS, Rogoz K, Kato J, Sandor K, Su J, Jimenez-Andrade JM, Finn A, Bersellini Farinotti A, Amara K, Lundberg K, Holmdahl R, Jakobsson PJ, Malmström V, Catrina AI, Klareskog L, Svensson CI. Autoantibodies to citrullinated proteins induce joint pain independent of inflammation via a chemokine-dependent mechanism. **Ann Rheum Dis**, 2016 Apr;75(4):730-8.
92. Zamanpoor M. The Genetic Pathogenesis, Diagnosis and Therapeutic insight of Rheumatoid Arthritis. **Clin Genet**, 2019;95(5):547-557.
93. Zhang Z, Zhang R, Li L, Zhu L, Gao S, Lu Q, Gu Y, Zhang Y, Yang H, Hou T, Zhen X, Zheng LT. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitor, Z-590 suppresses cartilage destruction in adjuvant-induced arthritis via inhibition of

macrophage inflammatory activation. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 2018 Apr;40(2):149-157.

94. Zhuang Y, Liu J, Ma P, Bai J, Ding Y, Yang H, Fan Y, Lin M, Li S, Hou Q. Tamarixinin A Alleviates Joint Destruction of Rheumatoid Arthritis by Blockade of MAPK and NF- κ B Activation. **Front Pharmacol**, 2017 Aug 15;8:538.

9. ANEXO 1

<p>USP - RIBEIRÃO <small>assistência - ensino - pesquisa</small></p>	<p>USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO</p>
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP				
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA				
Título da Pesquisa: PREDIÇÃO DE RESPOSTA TERAPÊUTICA AO METOTREXATE EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE ATRAVÉS DA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD39 COMO BIOMARCADOR				
Pesquisador: Paulo Louzada Junior Área Temática: Versão: 2 CAAE: 89092417.3.0000.5440 Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - Patrocinador Principal: Financiamento Próprio				
DADOS DO PARECER				
Número do Parecer: 2.724.944 Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto de pesquisa da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP, DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, DIVISÃO DE IMUNOLOGIA CLÍNICA, DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA - PROJETO DE PESQUISA - Nível: Doutorado.				
Resumo: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória que afeta 1% da população mundial e é caracterizada por um inalterado de células do sistema imune no espaço sinovial articular. A primeira escolha para o tratamento da AR consiste no uso de doses baixas de metotrexate (MTX). No entanto, uma parte considerável dos pacientes com AR é refratária ao tratamento com MTX (40-60%) e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não foi estabelecido. O efeito antiinflamatório do MTX associa-se com sua capacidade de aumentar os níveis extracelulares de adenosina (ADO). Neste contexto, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que pacientes com AR não responsivos ao tratamento com MTX (UR-MTX) apresentam uma menor expressão da ectonucleotidase CD39 em células T reguladoras (Tregs) circulantes. Esta ectonucleotidase é uma das principais vias de produção de adenosina extracelular, através da metabolização do ATP e ADP. Logo, a análise de alterações nas vias de regulação da expressão de CD39 em células Tregs é um passo importante para esclarecer os fenômenos relacionados a				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;"> Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE UF: SP </td> <td style="width: 50%;"> Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.045-900 Telefone: (16)3502-2228 Fax: (16)3503-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br </td> </tr> </table>			Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.045-900 Telefone: (16)3502-2228 Fax: (16)3503-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO Bairro: MONTE ALEGRE UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.045-900 Telefone: (16)3502-2228 Fax: (16)3503-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.724.644

primeira avaliação, para os respondedores e para os não-respondedores ao MTX. O cálculo amostral (120 pacientes) foi realizado utilizando-se a calculadora on-line disponível do site <http://www.calculoamostral.valia.com.br>. (SANTOS, Glauber Eduardo de Oliveira. Cálculo amostral: calculadora online. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.valia.com.br>>. Acesso em: [data do acesso: 15/11/2016]. As características quantitativas dos indivíduos serão comparadas usando o teste t-student, quando apropriado. Variáveis categóricas e as frequências genotípicas serão comparadas entre os grupos usando teste de Fisher. As análises estatísticas dos dados com múltiplos grupos serão realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo as diferenças consideradas significantes para valores de $P < 0,05$. A

validade preditiva, sensibilidade e especificidade dos valores de expressão de CD39 em Tregs (MFI) entre respondedores e não respondedores ao MTX serão calculadas utilizando o Receptor Operacional Characteristic (curva ROC). Os cálculos estatísticos serão realizados empregando os programas Instat 3 e MedCalc Statistical Software version 16.8.4 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

Critério de Inclusão:

Serão considerados critérios de inclusão: indivíduos com mais de 18 anos de ambos os sexos, início dos sintomas de AR há mais de 6 semanas e menos 24 meses, e DAS28 (Disease Activity Score- 28 joints) $> 3,2$ na primeira avaliação.

Critério de Exclusão:

Serão considerados critérios de exclusão: presença de doenças infecciosas e outras doenças autoimunes, uso prévio de DMARDs e uso de corticoide na primeira avaliação em doses equivalentes a prednisona $> 10\text{mg/dia}$.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram corrigidos de acordo com parecer emitido pelo CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão número 2. Data de modificação 09/06/2018, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão número 2. Data de modificação 09/06/2018, podem ser enquadrados na categoria

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.049-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3502-2226 Fax: (16)3503-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.734.944

APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_855592.pdf	09/06/2018 16:24:42		Aceito
Outros	Pendencias09062018.docx	09/06/2018 16:23:39	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_caio_09_06_2018.docx	09/06/2018 16:16:30	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_caio_09_06_18.docx	09/06/2018 16:15:31	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_caio07_05_2018.docx	07/05/2018 14:13:01	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Outros	Formulario_UFC.jpg	07/05/2018 14:02:33	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/05/2017 19:05:46	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	23/05/2017 19:05:32	CAIO CAVALCANTE MACHADO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.045-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3502-2225 Fax: (16)3533-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

10. ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Papel das NETs na fisiopatologia da artrite reumatoide*”, registrado com o número **241/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 01 de julho de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 30 camundongos C57Bl 6 machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 10 camundongos DBA/1J machos pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 01/07/2019 a 20/09/2021.

We certify that the Protocol *n° 241/2018*, entitled “*Role of NETs in the physiopathology of rheumatoid arthritis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/01/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 30 male C57Bl/6 mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School and 10 male DBS/1J mice weighing 20g from the Breeding Center of Special Mice of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/20/2019.

Ribeirão Preto, 01 de julho de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP