

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

GABRIELA VIEGAS HAUTE

**EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A APOPTOSE E FORMAÇÃO DE NETs  
DE NEUTRÓFILOS**

PORTO ALEGRE

2015

GABRIELA VIEGAS HAUTE

**EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A APOPTOSE E FORMAÇÃO DE NETs  
DE NEUTRÓFILOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica pelo Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

PORTO ALEGRE

2015

GABRIELA VIEGAS HAUTE

**EFEITO DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A APOPTOSE E FORMAÇÃO DE NETs  
DE NEUTRÓFILOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica pelo Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Martha Campos

Prof. Dr. Adroaldo Lunardelli

Profa. Dra. Aline Andrea Cunha

Prof. Dr. Márcio Fagundes Donadio (suplente)

Porto Alegre

2015

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

*(Charles Chaplin)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todos os dias da minha vida!

A meus pais, irmãos e primos pelo amor incondicional, compreensão e por acreditarem no meu sucesso. Agradeço por todo incentivo para realização deste sonho. Muito obrigada!

Ao meu marido por toda dedicação, esforço, e principalmente paciência e amor!

Ao meu querido orientador, professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pelos ensinamentos, dedicação como mestre e por acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas, Eduardo Caberlon, Fernanda Mesquita e Leonardo Pedrazza por todos os ensinamentos. Agradeço principalmente pela amizade e por me ajudarem a crescer profissionalmente e pessoalmente.

A todos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação pelo companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS, a CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Cassel por fornecer o Ácido Gálico para a realização desta pesquisa.

Aos meus queridos amigos e amigas por compreenderem meus momentos de ausência e por compartilharem comigo momentos de alegria e de tristeza, sempre me incentivando para realização deste sonho.

Agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte para a realização desta conquista.

Obrigada a todos!

## RESUMO

A primeira linha de defesa do organismo é feita por células fagocíticas como os neutrófilos. Apoptose e NETose dos neutrófilos são os dois maiores mecanismos de morte celular programada, que diferem em suas características morfológicas e em seus efeitos sobre o sistema imune. A apoptose é caracterizada pelo empacotamento da cromatina e dos fragmentos nucleares, porém esta morte por ser atrasada pela presença de patógenos ou pela presença de componentes químicos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Os neutrófilos possuem outra estratégia antimicrobiana, chamada armadilhas extracelulares (NETs), que contribuem para eliminação e controle do patógeno. A NETose é induzida por infecção, inflamação ou trauma e, representa um mecanismo de ativação da resposta imune inata. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Ácido gálico (AG) no controle da apoptose e formação de NETs de neutrófilos. Os resultados mostram que o AG diminuiu o efeito anti-apoptótico do LPS, bloqueou a liberação de NETs e preveniu a formação de radicais livres induzidos por LPS. Estes resultados demonstram que o AG pode ser um novo agente terapêutico no controle da resposta exacerbada do corpo contra um agente infeccioso.

Palavras chave: Inflamação, Ácido gálico, Neutrófilos, EROs, NETose, Apoptose

## **ABSTRACT**

The first line of defense of organism is made by phagocytic cells such as neutrophils. Apoptosis and NETosis of neutrophils are two major mechanisms of programmed cell death that differ in their morphological characteristics and effects on the immune system. Apoptosis is characterized by nuclear chromatin packaging and nuclear fragments and this death can be delayed by the presence of pathogens or chemicals components such as lipopolysaccharide (LPS). Neutrophils have other antimicrobial strategy, called neutrophil extracellular traps (NETs), which contributes to the elimination and control of the pathogen. NETosis is induced by infection, inflammation or trauma and represents an innate immune activation mechanism. The objective of this study was to evaluate the effect of Gallic acid (GA) in the control of apoptosis and release NETs. The results show that GA decreased the anti-apoptotic effect of LPS, blocked the induction of NETs and prevented the formation of free radicals induced by LPS. These findings demonstrate that the GA is a novel therapeutic agent for decreasing the exacerbated response of the body against an infectious agent.

Keywords: Inflammation, Gallic acid, Neutrophils, ROS, NETosis, Apoptosis

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG - Ácido Gálico

ERNS - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

IL - 1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

IL - 6 - Interleucina 6

IL - 8 - Interleucina 8

LPS - Lipopolissacarídeo

MPO - Mieloperoxidase

NE - Elastase de neutrófilos

NETs - Neutrophil extracellular traps

PBS - Tampão Fosfato Salino

PHA - Fitohemaglutinina

PMNs - Polimorfonucleares

TLR4 - Toll-like receptor 4

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral-alfa



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Mecanismo de liberação de NETs \_\_\_\_\_ 14

Figura 2: Estrutura química do AG \_\_\_\_\_ 15

### CAPÍTULO 3

Figura 1 - Efeito do AG nas células mononucleares estimuladas com PHA\_\_51

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....     | <b>11</b> |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>16</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....      | <b>17</b> |
| 3.1 Objetivo geral .....       | 17        |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 17        |

### CAPÍTULO 2

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>4. ARTIGO CIENTÍFICO</b> ..... | <b>18</b> |
|-----------------------------------|-----------|

### CAPÍTULO 3

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> ..... | <b>49</b> |
| 5.1 Resultados complementares .....  | 51        |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....          | <b>52</b> |
| <b>7. ANEXO I</b> .....              | <b>54</b> |
| <b>8. ANEXO II</b> .....             | <b>56</b> |
| <b>9. ANEXO III</b> .....            | <b>64</b> |

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Inflamação

A inflamação é a reação local dos tecidos à agressão, a qual ocorre inespecificamente causando uma série de alterações que tendem a limitar os efeitos da agressão, como: dilatação de arteríolas, aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo; exsudação de fluídos, incluindo proteínas plasmáticas; e migração de leucócitos para o foco inflamatório. Esta reação tem como objetivo destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor. [1-3] A inflamação é caracterizada por cinco sinais cardiais: rubor, calor, tumor, dor e eventualmente perda de função e pode ser dividida em aguda ou crônica conforme o tempo de permanência do processo.

Na inflamação aguda ocorre um acúmulo de líquido, fibrina, leucócitos (principalmente neutrófilos) e hemácias no local onde ocorreu a agressão. A primeira linha de defesa do organismo é feita por células fagocitárias, como neutrófilos, macrófagos e monócitos. Os leucócitos fagocitam agentes lesivos, matam bactérias, degradam tecidos necróticos e antígenos estranhos. [3-5] Quando os neutrófilos chegam ao local inflamado, já estão equipados com as proteínas necessárias para destruir o agente agressor. [6] O encontro com o patógeno, causa sua ativação e imersão do microrganismo em seu fagossomo. [4-6] No fagossomo ocorrem dois eventos: primeiro, há grande geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, segundo, os grânulos dos neutrófilos fundem-se ao fagossomo, descarregando enzimas e peptídeos antimicrobianos, juntos estes dois eventos levam a morte microbiana. [7, 8] Infelizmente estas células também podem prolongar a inflamação e induzir dano tecidual pela grande liberação de enzimas líticas de seus grânulos, mediadores químicos, por gerar grande quantidade de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). [5]

A reação inflamatória é mediada endogenamente por substâncias ativas, denominadas “mediadores inflamatórios” e a produção excessiva destes mediadores leva ao aumento da resposta do hospedeiro, causando assim um

desequilíbrio metabólico que pode propagar a resposta inflamatória. [3, 5, 9, 10] O choque séptico é um exemplo do aumento da resposta inflamatória descontrolada que resulta em um desequilíbrio metabólico. [11] As complicações do choque estão principalmente relacionadas com a liberação de componentes da parede bacteriana. O LPS e, principalmente o ácido teicóico de microorganismos gram-positivos, desencadeiam indiretamente a cascata inflamatória, pela indução da produção de citocinas pelos macrófagos e monócitos que quando ativados, produzem sequencialmente, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) que interagem com outras células e elementos celulares (polimorfonucleares, células do endotélio, células de fibroblastos, plaquetas e monócitos), induzindo a produção e liberação de mediadores secundários, que contribui para uma resposta inflamatória tardia. [12] O excesso de produção ou expressão inapropriada destes fatores pode conduzir a uma variedade de condições patológicas, incluindo a toxicidade sistêmica e choque séptico. [11, 13]

A inflamação crônica é a soma das reações do organismo por consequência da permanência do agente agressor que não foi eliminado pelos mecanismos da inflamação aguda. A inflamação crônica é caracterizada pelo predomínio de células mononucleares (linfócitos, macrófagos, plasmócitos) no local inflamado. [10]

## **1.2 Apoptose e NETose**

Apoptose e NETose, são dois importantes mecanismos de morte celular programada que diferem nas suas características morfológicas e os seus efeitos sobre o sistema imunológico. A apoptose é caracterizada pelo empacotamento da cromatina nuclear e dos fragmentos nucleares, ocorrendo, posteriormente, a absorção das células apoptóticas por fagócitos que geralmente suprimem a resposta imune. [14]

Os neutrófilos sob condições fisiológicas sobem apoptose em aproximadamente 20 horas. Entretanto, em tecidos infectados esta morte programada é retardada por componentes microbianos como

lipopolissacarídeo (LPS) e por estímulos pró-inflamatórios. [3, 9]. A apoptose dos neutrófilos é um ponto importante no controle fisiológico da resposta imune, tendo um importante papel na regulação das populações celulares adultas e na resolução da inflamação. Neste contexto, a morte dos neutrófilos deve ser adiada até que as funções essenciais de fagocitose do patógeno sejam concluídas, e em seguida estas células devem morrer para anular a inflamação e evitar danos teciduais. [7, 15]

Estudos recentes mostram que os neutrófilos possuem outro mecanismo antimicrobiano denominado NETose, que pode ser induzida por infecção, inflamação ou trauma e representa um mecanismo de ativação da resposta imune inata. [14] Quando os neutrófilos são ativados por substâncias químicas tais como, PMA (phorbol myristate acetate), interleucina-8 (IL-8), endotoxinas das bactérias gram-negativas (lipopolissacarídeo - LPS), ou por bactérias gram-positivas ou fungos, liberam cromatina para o meio extracelular, as quais estão associadas a diferentes proteínas, formando um complexo de armadilhas extracelulares chamadas NETs (neutrophil extracellular traps). Os NETs são abundantes em locais inflamados, como encontrado em pacientes com apendicite, pré-eclâmpsia e com infecção por *Streptococcus pneumoniae*. [5]

Os NETs são importantes em proceder e matar as bactérias, provocando o confinamento do patógeno no local da infecção. Entretanto, estudos recentes sugerem que esta ação pode provocar dano tecidual pela exposição de proteases que estão associadas as redes, as quais podem provocar lesões celulares. Por um lado, os NETs representam um mecanismo fundamental para a morte de microrganismos, prevenindo que o mesmo se dissemine pelo organismo a partir do local da infecção. Por outro lado, a formação dos NETs pode ter efeitos deletérios para o hospedeiro devido a liberação de proteínas, como as proteases, que podem lesionar os tecidos adjacentes [16], como representado na Figura 1.

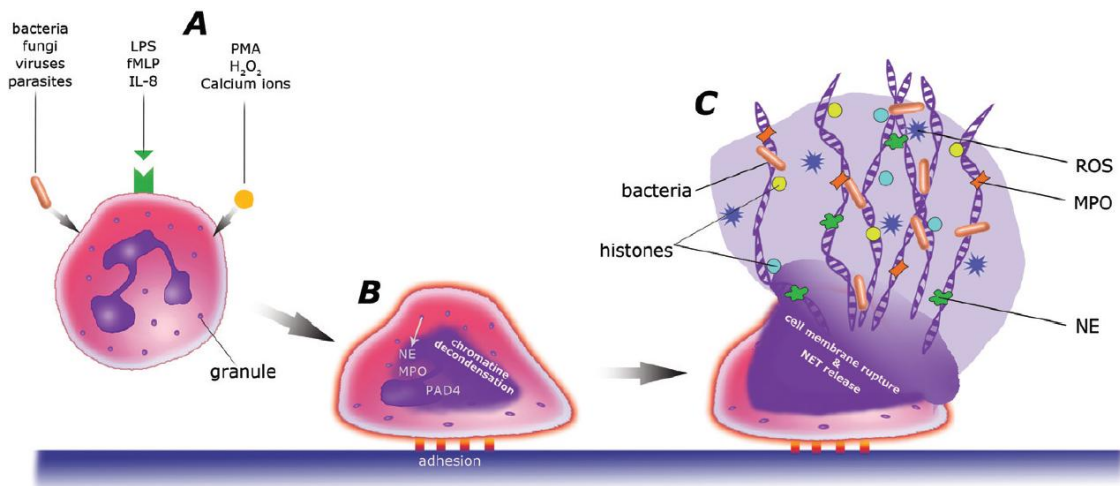


Figura 1: Mecanismo de liberação de NET (NE - elastase de neutrófilos, MPO - mieloperoxidase, ROS - espécies reativas de oxigênio). **A**: estimulação de receptores por (bactérias, fungos, vírus, parasitos, fatores químicos, como PMA ou LPS) leva a aderência de neutrófilos ao endotélio e a descondensação de cromatina, devido a clivagem da histona pela elastase de neutrófilos e pela mieloperoxidase **B**. Na fase final, os NETs são liberados e as bactérias ficam presas as armadilhas **C**. [17]

### 1.3 Ácido Gálico

Atualmente está sendo pesquisada a ação de novas drogas contra processos inflamatórios. Devido a abundância de nossa flora, muitos pesquisadores tentam encontrar novas moléculas anti-inflamatórias no meio vegetal, onde tem se destacado os compostos ricos em produtos fenólicos.

O Ácido gálico (AG) é um composto fenólico encontrado em várias plantas, frutas e alimentos, estando presente tanto na forma livre quanto como um dos ingredientes dos taninos. [18, 19] Tem poder antioxidante, anti carcinogênico e propriedades antivirais. Outros estudos relatam que o ácido gálico possui também ação antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antimalária e anti- herpética, sendo encontrado em algumas das bebidas mais consumidas no mundo, tais como chá verde. [18, 20-22] Na Figura 2 mostramos a estrutura química do AG.

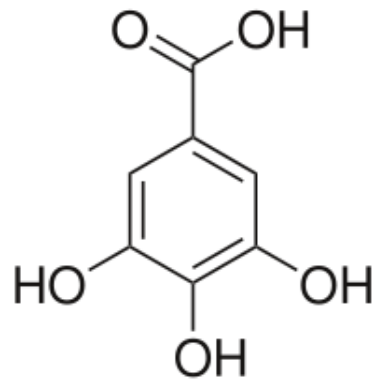


Figura 2: Estrutura química do ácido gálico.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A inflamação é um grave problema para os sistemas de saúde em todo o mundo. A apoptose e a formação de NETs são mecanismos importantes para a defesa do organismo contra infecções, entretanto o controle destes processos é importante para que não sejam deletérios para o organismo. O número de casos de pessoas com doença inflamatória está cada vez maior, sendo assim novas drogas com poder de modular a resposta excessiva do hospedeiro estão sendo vistas como estratégias para mudar e melhorar os resultados dos tratamentos.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do AG no controle da apoptose e formação dos NETs de neutrófilos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a citotoxicidade do AG em neutrófilos e em células mononucleares
- Avaliar a citotoxicidade do LPS e AG + LPS em neutrófilos
- Avaliar o efeito do AG sobre a apoptose dos neutrófilos
- Avaliar o efeito do AG sobre a formação de NETs de neutrófilos ativados com LPS
- Avaliar o efeito antioxidante do AG
- Avaliar o efeito do AG sobre a formação de EROs de neutrófilos
- Avaliar o efeito do AG sobre a liberação de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ ) pelos neutrófilos.

## **CAPÍTULO 2**

### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico *Biochemical Pharmacology*

Fator de impacto: 4.650

## **Gallic acid reduces the effect of LPS on apoptosis and Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps**

Gabriela Viegas Haute<sup>1</sup>, Eduardo Caberlon<sup>1</sup>, Eamim Squizani<sup>1</sup>, Fernanda Cristina de Mesquita<sup>1</sup>, Leonardo Pedrazza<sup>1</sup>, Bianca Andrade Martha<sup>1</sup>, Denizar Alberto de Mello<sup>1</sup>, Eduardo Cassel<sup>2</sup>, Rafael Sanguinetti Czepielewski<sup>3</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>2</sup> Laboratório de Operações Unitárias, Department of Chemical Engineering, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

<sup>3</sup> Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

<sup>\*</sup> To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6681, prédio 12, bloco C, sala 221, CEP 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, E-mail: gabriela.viegas2@gmail.com

## ABSTRACT

The first line of defense of organism is made by phagocytic cells such as neutrophils. Apoptosis and NETosis of neutrophils are two major mechanisms of programmed cell death that differ in their morphological characteristics and effects on the immune system. Apoptosis is characterized by nuclear chromatin packaging and nuclear fragments and this death can be delayed by the presence of pathogens or chemicals components such as lipopolysaccharide (LPS). Neutrophils have other antimicrobial strategy, called neutrophil extracellular traps (NETs), which contributes to the elimination and control of the pathogen. NETosis is induced by infection, inflammation or trauma and represents an innate immune activation mechanism. The objective of this study was to evaluate the effect of Gallic acid (GA) in the control of apoptosis and NETs release. The results show that GA decreased the anti-apoptotic effect of LPS, blocked the induction of NETs and prevented the formation of free radicals induced by LPS. These findings demonstrate that the GA is a novel therapeutic agent for decreasing the exacerbated response of the body against an infectious agent.

Keywords: Inflammation, Gallic acid, Neutrophils, ROS, NETosis, Apoptosis

## 1. INTRODUCTION

Sepsis is a complex syndrome that results in an exaggerated systemic inflammatory response against an infectious agent. [1, 2] This reaction aims to destroy, dilute or immobilize the infectious agent. [3] The inflammations are divided into acute and chronic. Acute inflammation is characterized by the accumulation of fluid, fibrin, leukocytes (especially neutrophils) and red blood cells in the place where the aggression occurred. When neutrophils arrive at the inflamed site, are already equipped with the necessary proteins to destroy the infectious agent. [4] The encounter with the pathogen causes the activation of the cells with the immersion of the microorganism in a phagosome. [4-6] In the phagosome two events occur: first, there is great generation of reactive oxygen species (ROS), and second, the granules of neutrophils merge the phagosome, unload antimicrobial peptides and enzymes. Together these two events lead to microbial death. [7, 8] The inflammatory reaction is mediated endogenously by active substances, called "inflammatory mediators" and excessive production of these mediators leads to an increase in host response, causing a metabolic imbalance that can propagate the inflammatory response. [3, 6, 9, 10]

Chronic inflammation is the sum of the reactions of the organism as consequence of the offending agent residence, which was not eliminated by the mechanisms of acute inflammation. [10] Septic shock is an example of the increase in uncontrolled inflammatory response that results in a metabolic imbalance. [11] The shock and the complications are mainly related to the release of components of the bacterial wall. The LPS and teichoic acid especially gram-positive microorganisms indirectly trigger the inflammatory cascade, by induction of cytokine production by macrophages and monocytes when activated, produces sequentially, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8). These cytokines interact with other cells and cellular elements (polymorphonuclear cells, endothelial cells, fibroblast cells, platelets and monocytes), inducing production and release of secondary mediators, which contributes to a delayed inflammatory response. [12] The overproduction or inappropriate expression of

these factors can lead to a variety of pathological conditions, including septic shock and systemic toxicity. [10, 11, 13]

NETosis and apoptosis are two major mechanisms of programmed cell death that differ in their morphological characteristics and their effects on the immune system. [14] Apoptosis is characterized by packaging of nuclear chromatin and nuclear fragments, subsequently occurs absorption of apoptotic cells by phagocytes, which generally suppress the immune response. Neutrophils under physiological conditions suffer apoptosis in 20 hours. However, in infected tissues it can be delayed by microbial components such as LPS and pro-inflammatory stimuli. [3, 9] The apoptosis of neutrophils is an important point in the physiological control of the immune response, playing an important role in the resolution of inflammation. In this context, apoptosis should be delay until the essential functions of pathogen phagocytosis to complete, but then these cells must die to undo the inflammation and prevent tissue damage. [7, 15]

Recent studies have shown that neutrophils have another antimicrobial mechanism called NETosis, which can be induced by infection, inflammation or trauma and represents an innate immune activation mechanism. [14] When neutrophils are activated by PMA (phorbol myristate acetate), interleukin-8 (IL-8), gram-positive bacteria or endotoxin of gram-negative bacteria (lipopolysaccharide - LPS) or fungi, release means for the chromatin that are associated with different proteins, forming a complex called neutrophil extracellular traps (NETs), which capture and kill pathogens. [6, 16] The NETs are abundant in inflamed sites, as found in patients with appendicitis, preeclampsia and to infection by *Streptococcus pneumoniae*. [6] Some studies suggest a pathophysiological role of NETs and components of NETs in autoimmune diseases such as small vessel vasculitis, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus (SLE), psoriasis, and rheumatoid arthritis. [16-18] Recent studies suggest that this action may cause tissue damage and the control of NETs release can result in beneficial effects in autoimmune diseases. [16,19]

Currently is being researched the action of new drugs against inflammatory processes. Gallic acid (GA) is a phenolic compound found in

various plants, fruit and food, has antioxidant properties, anti-carcinogenic, anti-viral properties. [20, 21] Other studies report that the GA also has antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, anti-malarial and anti-herpetic effect, being found in some of the most consumed beverages in the world, such as green tea. [20-22] The objective of this study was to evaluate the effect of GA in the control of apoptosis and formation of NETs in primary cultures of human neutrophils.

## 2. MATERIALS & METHODS

**ETHICS STATEMENT:** The study experimental protocol (443.648) was approved by the Ethics Research Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

### 2.1 PERIPHERAL BLOOD POLYMORPHONUCLEAR CELLS PREPARATION:

The peripheral blood polymorphonuclear cells (PMNs) were isolated from the blood of healthy human by gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE althcare). A total of 12mL of heparinized blood was diluted 1: 2 with saline solution. Each 2mL of Ficoll-Paque were added to 6 mL of the previous dilution and centrifuged at 720 x g at 22°C for 20 minutes. After centrifugation, the supernatant was removed and added ammonium chloride to lyse erythrocytes. The gradient was centrifuged at 200 x g at 4°C for 10 minutes, this procedure was repeated twice. After this, the pellet of the cells was washed twice in 10mL of phosphate buffered saline (PBS). The cells were then re-suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 0.15% garamycin (Schering-Plough) and 20% homologous serum at a final cell density of  $2.0 \times 10^6$  cells/mL.

Cell viability was observed by counting cells in a Neubauer chamber by Trypan Blue dye exclusion, was uniformly greater than or equal to 90%, purity of this preparation was  $\geq 95\%$  of neutrophils. All reagents used were filtered through a disposable sterile filter unit 0.22  $\mu$ M (Millex). All human subjects read and signed an informed consent.

Groups: Control cells; LPS - *Escherichia coli* 026:B6 (50ng /mL); GA (Sigma); LPS (50ng/mL) + GA. The control group was composed of RPMI 1640 medium and cell concentration  $2.0 \times 10^5$  cells/200 $\mu$ L. Group LPS (50ng/mL) was diluted in medium and added directly to the cells at the stated concentration. In the GA and GA + LPS group, the two drugs were diluted in medium and then added to the cells, we used 96-well microtiter bottomed flat plates (Nunc). All groups were made in triplicate.

### 2.2 PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS PREPARATION:

The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the blood of healthy human by gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE althcare). A total



of 12mL of heparinized blood was diluted 1: 2 with saline solution. Each 2mL of Ficoll-Paque were added to 6mL of the previous dilution and centrifuged at 720 x g at room temperature for 20 minutes. The cells, including T lymphocytes, were removed from the interface formed by centrifugation with a sterile Pasteur pipette and washed twice in 10mL PBS. The cells were then re-suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 0.15% garamycin (Schering-Plough) and 20% homologous serum at a final cell density of  $1.6 \times 10^6$  cells/mL.

Cell viability was observed by cell counting in a Neubauer chamber Cell viability was observed by counting cells in a Neubauer chamber by Trypan Blue (Sigma) dye exclusion, was uniformly greater than or equal to 90% purity. All reagents used were filtered through a disposable sterile filter unit 0.22  $\mu$ M (Millex). All human subjects read and signed aninformed consent.

Groups: Control cells; GA. The control group was composed of RPMI 1640 and mononuclear cells in the concentration  $1.6 \times 10^5$  cells/200 $\mu$ L. The concentrations of GA were dissolved in RPMI 1640 medium and added directly to cells, we used 96-well microtiter bottomed flat plates (Nunc). All groups were made in triplicate.

2.3 CYTOTOXICITY ASSAY: The cellular viability of GA, LPS and GA + LPS in neutrophils ( $2.0 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L) was performed by Trypan Blue (Sigma) dye exclusion after 16 hours of incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. The cellular viability of GA in mononuclear cells ( $1.6 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L) was performed by Trypan Blue (Sigma) dye exclusion after 96 hours of incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator.

APOPTOSIS ASSAY: Neutrophil apoptosis was evaluated by counting 300 cells on slides, the cells were centrifuged in a cytospin at 3.000rpm for 10 minutes and stained with May-Grunwald-Giemsa. The differentiation of apoptotic and non-apoptotic neutrophils was made through the analysis of their morphology. Apoptosis was also evaluated by Annexin V (BD Biosciences) assay by the method of flow cytometry.

**2.5 INDUCTION AND DETECTION OF NETs:** NETs formation of neutrophils was quantitated in the supernatants of PMNs ( $2.0 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L) were incubated for 16 at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. The NETs were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kit (Invitrogen). The fluorescence intensity was monitored VICTOR ® microplate reader at an excitation wavelength of 485nm and an emission wavelength of 535nm, calibrated by standard curve, using a standard DNA of known concentration.

The preview of NETs formation was analyzed using the Kit Falcon™ Culture Slide (BD Biosciences). Cells were seeded on poly-L-lysine coated cover slips, allowed to adhere for 1 hour, the cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L) were incubated for 16 at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator.. Post-NETosis induction, the supernatant was removed, the cells were fixed with formaldehyde 4% for 2 hours and after were blocked for 2h with 10% fetal bovine serum (FBS) in phosphate buffered saline (PBS) with 0.03% and Triton X-100 for 30 minutes. To stain the NETs, samples were incubated with a primary monoclonal antibody - Mouse Anti-Myeloperoxidase (1:200) for 30 minutes and with a secondary antibody - Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L) Fluorescein (FITC) Conjugate - (1:500) for 30 minutes. After staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 2 minutes. The NETs formation was visualized by confocal immunofluorescent microscopy.

**2.6 ANTIOXIDANT ACTIVITY DPPH:** The DPPH method is based on the capture of DPPH radical (2',2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) by antioxidants, producing a decrease absorbance at 515nm. The free radical scavenging activity was followed by preparing DPPH solution (60 $\mu$ M) in methanol. Vitamin C 1mg/mL was taken as the reference standard. Different concentration of GA (25, 50 and 100 $\mu$ M) and Vitamin C (1mg/mL) were prepared using methanol. 0,975mL of DPPH solution (60 $\mu$ M) was mixed with 25 $\mu$ L of all the concentration of GA. These mixtures were kept in dark about 5 minutes and measured the absorbance at 515nm. Optical density of control was considerate 100% of DPPH.

**2.7 ROS PRODUCTION:** The generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) of neutrophils ( $2.0 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L) was evaluated based on

the intracellular peroxide-dependent oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) which forms a fluorescent compound, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were cultured in 96-well culture plates. Sixteen hour after the treatment with GA, the culture medium was removed; cells were washed twice with PBS and then incubated with 200 $\mu$ L/ well of phosphate buffer containing 10 $\mu$ M of DCFH-DA at 37°C for 30 minutes. The fluorescence intensity was monitored VICTOR <sup>®</sup> microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm.

2.8 IL-6, IL-8 AND IL-1 $\beta$  CYTOKINES QUANTIFICATION: Cytokines production was evaluated in the supernatants of PMNs (2.0 x 10<sup>5</sup> cells/200  $\mu$ L) incubated for 16 at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. For the dosage of IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  was used Cytometric Bead Array Kit - CBA (BD Biosciences) and analysis was performed by flow cytometry.

2.9 STATISTICAL ANALYSIS: The normality of the data was analyzed by the Shapiro-Wilk test. The measures were parametric and then we calculated the mean and standard deviations of the mean for each of the variables analyzed. For comparison between groups was applied analysis of variance (ANOVA) and post hoc LSD Test for multiple comparisons. The differences were considered significant when the statistical analysis gives  $P < 0.05$ . SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 18.0 for Windows was used as a computational tool to analyze statistical data.

### 3. RESULTS

#### 3.1 *Effect cytotoxic of GA, GA + LPS and LPS in human neutrophils*

To evaluate cytotoxic effect, cells were exposed to different concentrations of GA. The GA did not decreased cell viability (Figure 1). We tested the toxicity of LPS and neither concentration tested showed decrease cell viability (Figure 2). LPS (50ng/mL) was associated with different concentration of GA and only GA 1600 $\mu$ M + LPS concentration demonstrated toxicity (Figure 3).

#### 3.2 *Effect cytotoxic of GA in human mononuclear cells*

To evaluate cytotoxic effect in other blood cells, mononuclear cells were exposed to different concentrations of GA. The concentration 200, 400, 800 and 1600 $\mu$ M of GA decreased the cell viability (Figure 4). From these results, we decided to follow the research with the concentrations 25, 50 and 100 $\mu$ M of GA.

#### 3.3 *Effect of GA, GA + LPS and LPS on apoptosis of human neutrophils*

To analyze apoptosis induction, cells were exposed to concentrations 25, 50 and 100 $\mu$ M of GA and LPS (50ng/mL). The GA alone did not induce apoptosis (Figure 5 A and C), but LPS showed significant anti-apoptotic effect and the GA decreased this effect (Figure 5 B and C). Apoptosis was also evaluated by optical microscopy (Figure 6), we could verify the morphological differences of cell in apoptosis (the nucleus loses its original shape) and the normal cell. These results confirm the results obtained by flow cytometry.

#### 3.4 *Effect of GA, GA + LPS and LPS in the release of NETs of human neutrophils*

The GA (25, 50 and 100 $\mu$ M) alone did not induce the formation of NETs (Figure 7 A). LPS (50ng/mL) increase in the NET formation and the GA decreased the LPS effect (Figure 7 B). This effect was visualized using immunofluorescence confocal microscopy (Figure 8).

#### 3.5 *Antioxidant effect of GA and Vitamin C*

We observed that all concentration of GA decreased the free radical DPPH, showing a similar effect to Vitamin C (Figure 9).

### 3.6 *Effect of GA, GA + LPS and LPS on ROS release*

We observed that the GA alone did not induce the formation of ROS (Figure 10 A). The LPS induced the ROS release and GA decreased significantly this effect (Figure 10 B).

### 3.7 *Effect of GA + LPS and LPS on cytokine release*

Cytokines has a key role in the resolution of inflammation, for this reason we decided to quantify the cytokines released by activated neutrophils. The cells stimulated with LPS increased the IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  cytokines release (Figure 11 A, B and C) and GA treatment decreased only IL-1 $\beta$  cytokine release in concentrations of 50 and 100 $\mu$ M.

#### 4. DISCUSSION

Neutrophils are the first cells to reach at the site of inflammation. In response to inflammatory stimuli, they migrate from the circulation blood to infected tissues, where efficiently bind, engulf, and inactivate bacteria. [4] These cells have a short half-life and die by apoptosis in a few hours. The presence of pathogens contribute to prolonging the life of neutrophils in the infected site. The permanence of these cells in the inflamed site, for a certain time, it is beneficial to the host because it helps against the invasion, but on the other hand this can lead to tissue damage by excessive release of toxic products. Neutrophils have other antimicrobial strategy, called NETosis, which results in the death of these cells, and contributes to the elimination of the pathogen. [5, 23-25] Our study aim to investigate the in vitro action of GA on apoptosis and NETosis of human neutrophils induced by LPS.

Our initial results showed that GA is not cytotoxic in neutrophils. In order to verify their possible cytotoxicity in other blood cells, we made experiments in primary cultures of human mononuclear cells. We found out that the concentrations of 200, 400, 800 and 1600 $\mu$ M of GA decreased cell viability, thus it cannot be used for therapeutic purposes. For this reason, we chose concentrations 25, 50 and 100 $\mu$ M to follow the study.

Our study showed that LPS decreased apoptosis in neutrophils. It is reported that LPS acts directly on TLR4 receptor and for consequence of this binding, occurs activation and increased in lifetime of the cells. Neutrophil apoptosis is essential in regulating adult cell populations and in resolution of inflammation. When occurs an attack in tissue, these cells die slowly in order to control the infection, however they should die by apoptosis immediately after the combat against the pathogen. When LPS bind in TLR4 receptor, these cells release cytokines and produce ROS, and these inflammation mediators cause tissue damage. [4, 27, 28] GA showed decrease the anti-apoptotic effect of LPS, which indicate a protective role against tissue damage caused by infection.

Studies describe that neutrophils, when activated by chemicals or pathogens, suffer NETosis and release NETs to the extracellular medium. [4] These NETs are important to control and kill bacteria, [4] however, recent studies suggest that this action may cause tissue damage. Thus, on the one hand the NETs represent a beneficial mechanism that is essential for the death of microorganism, preventing its spread in the body. On the other hand, the formation of NETs may have deleterious effects to the host due to release of proteins, as proteases, which can injure the adjacent tissues. [16] The GA decreased significantly the NETs release.

NETosis in response to chemical and biological stimuli is mediated by ROS production involving NADPH oxidase and MPO. [4, 5] Preclinical studies have shown that GA possesses a variety of pharmacological actives, which include mainly its action antioxidant and anti-inflammatory. In animal models, GA reduces oxidative stress and enhances the levels of glutathione (GSH), GSH peroxidase, GSH reductase, and GSH S-transferase in hepatic tissue, as well as catalase in serum. [26] In our study, the GA demonstrated antioxidant action, equivalent to the antioxidant power of Vitamin C. The GA decreased ROS levels released by neutrophils after induction with LPS, for consequence of these events, the GA decreased the NETs release. Since ROS-dependent NETosis is also believed to play detrimental effects in autoimmune inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, small-vessel vasculitis and lupus nephritis, pharmacological inhibition of ROS-dependent NET formation could have a therapeutically effect on these disorders. The flavonoids are potentially effective in treatment for these disorders, [13] for this reason the GA can also be potentially effective in the treatment of these diseases.

In response to stimuli pro-inflammatory, the neutrophils are activated to reduce the action of pathogen on the tissue. [28] It is reported that when neutrophils are activated by LPS, synthesize pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$ . [28, 29] Our results corroborate these studies demonstrating that LPS significantly increases the release of these cytokines. Even though several pro-inflammatory cytokines have been associated with the

early phase of acute gouty arthritis, growing evidence derived from experimental and clinical studies indicates a pivotal role for IL-1 $\beta$  in the initiation of inflammation. [29] Experimental studies showed which IL-1 $\beta$  mediates the anti-apoptotic effect of LPS [30] and has protective effects against bacterial infection. Studies in humans have demonstrated that antagonists of IL-1 $\beta$  receptors is associated with increased susceptibility to bacterial infections. IL-1 $\beta$  exerts its protective effect against infection by the activation of many responses, which include rapid recruitment of neutrophils to the site of inflammation. However, when there is excessive inflammation, and, therefore an excessive release of IL-1 $\beta$  is cause of severe mortality. Excessive recruitment of neutrophils is known to cause tissue damage leading to multiple organ dysfunction and death. Our results demonstrated that GA decreases the effect of LPS on IL-1 $\beta$ , but did not reverse the increase of IL-6 and IL-8. We showed that the GA modulates the release of IL-1 $\beta$ , and for this reason, exerts protective action against infections.



## 5. CONCLUSION

In this study, we demonstrated for the first time which the GA significantly inhibit the release of ROS and formation of NETs in primary human neutrophils, indicating a correlation between these two phenomena. Our results showed also which the GA reduces the anti-apoptotic effect of LPS in these cells. The GA actions showed in this study suggest its use as a therapeutic strategy in diseases mediated by activation of neutrophils.

## 6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from CNPq, RS - Brazil. G.V.H. received a fellowship from PUCRS.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Bone, R.C., C.J. Grodzin, and R.A. Balk, *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process*. Chest, 1997. 112(1): p. 235-43.
2. Matot, I. and C.L. Sprung, *Definition of sepsis*. Intensive Care Med, 2001. 27 Suppl 1: p. S3-9.
3. Teixeira, C.F., et al., *Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2*. Toxicon, 2003. 42(8): p. 947-62.
4. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. 303 (5663): p. 1532-5.
5. Guimarães-Costa, A.B., et al., *ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death*. J Parasitol Res, 2012. p. 929743.
6. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. 176(2): p. 231-41.
7. Vaughan, R.K., *Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor*, L. Stokes, Editor 2013: The Journal of Immunology. p. 8544-8553.
8. Liu, J., et al., *Induction of neutrophil death resembling neither apoptosis nor necrosis by ONO-AE-248, a selective agonist for PGE2 receptor subtype 3*. J Leukoc Biol, 2000. 68(2): p. 187-93.
9. Esmann, L., et al., *Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells*. J Immunol, 2010. 184(1): p. 391-400.
10. Mello, O.R., *N-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate: immunomodulatory effects on mononuclear cell culture*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2012. p. 149-155.
11. Radic, M., *Clearance of Apoptotic Bodies, NETs, and Biofilm DNA: Implications for Autoimmunity*. Front Immunol, 2014. 5: p. 365.
12. Sulowska, Z., et al., *Flow cytometric evaluation of human neutrophil apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants*. Mediators Inflamm, 2005.(2): p. 81-7.
13. Kirchner, T., et al., *Flavonoids and 5-aminosalicylic acid inhibit the formation of neutrophil extracellular traps*. Mediators Inflamm, 2013. p. 710239.
14. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. 198(5): p. 773-83.
15. Saffarzadeh, M. and K.T. Preissner, *Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection*. Curr Opin Hematol, 2013. 20(1): p. 3-9.
16. Meng, W., et al., *Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice*. Crit Care, 2012. 16(4): p. R137.
17. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. 115(6): p. 457-69.
18. Thijs, L.G. and C.E. Hack, *Time course of cytokine levels in sepsis*. Intensive Care Med, 1995. 21 Suppl 2: p. S258-63.
19. Vilcek, J. and T.H. Lee, *Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions*. J Biol Chem, 1991. 266(12): p. 7313-6.
20. You, B.R., et al., *Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion*. Mol Cell Biochem, 2011. 357(1-2): p. 295-303.
21. Chandramohan Reddy, T., et al., *Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- $\kappa$ B inactivation*. Toxicol In Vitro, 2012. 26(3): p. 396-405.

22. Eslami, A.C., et al., *Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study*. Chem Cent J, 2010. 4: p. 15.
23. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. 5(5): p. 415-8.
24. Wallach-Dayana, S.B., et al., *Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 290(4): p. L790-L796.
25. Meng, W., et al., *Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice*. Crit Care, 2012. 16(4): p. R137.
26. Chen, C.Y., et al., *Gallic Acid Induces a Reactive Oxygen Species-Provoked c-Jun NH2-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. p. 613950.
27. Sabroe, I., S.K. Dower, and M.K. Whyte, *The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 7: p. S421-6.
28. Sabroe, I., et al., *Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses*. J Immunol, 2002. 168(9): p. 4701-10.
29. Mitroulis, I., et al., *Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout*. PLoS One, 2011. 6(12): p. e29318.
30. Mitroulis, I., K. Kambas, and K. Ritis, *Neutrophils, IL-1beta, and gout: is there a link?* Semin Immunopathol, 2013. 35(4): p. 501-12.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Effect of GA on the viability of neutrophils. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). Data were expressed as cells number.

Figure 2 - Effect of LPS on the viability of neutrophils. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). Data were expressed as number of cells.

Figure 3 - Effect of GA + LPS and LPS on the viability of neutrophils. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 4). Data were expressed as cells number. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control group.

Figure 4 - Effect of GA on the viability of mononuclear cells. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). Data were expressed as cells number. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  compared with control group.

Figure 5 - Effect of GA, GA + LPS and LPS on the apoptosis of neutrophils. (A) Cells exposed to different concentrations of GA. (B) Cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and different concentrations of GA. (C) Annexin V and 7-AAD staining were used to quantify the percentage of apoptotic cells. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). Data were expressed as percentage. \*  $P < 0.05$  compared with control group.

Figure 6 - Morphological changes of the cells after LPS stimulation visualized by optical microscopy. In this image we could verify the morphological differences of cell in apoptosis. (A) The nucleus of apoptotic cells loses its original shape. (B) The normal cell. Cells were exposed to different concentrations of GA, LPS (50ng/mL) and GA + LPS.

Figure 7 - Effect of GA, GA + LPS and LPS on the NETs formation. (A) Cells were exposed to different concentrations of GA. (B) Cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and different concentrations of GA. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). Data were expressed as ng DNA/ $2 \times 10^5$  cells. \*\*  $P < 0.01$  compared with control group; #  $P < 0.001$  compared with LPS group.

Figure 8 - NET formation after LPS stimulation visualized by fluorescence. The image of control shows the nuclear localization of DNA, the LPS group shows the extracellular localization of DNA (blue fluorescence) and the granular pattern of MPO (green fluorescence).

Figure 9 - Antioxidant effect of GA and Vitamin C. Data were expressed as percentage of control group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control group.

Figure 10 - Effect GA, GA + LPS and LPS in the ROS release. (A) Cells were exposed to different concentrations of GA. (B) Cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and different concentrations of GA. The data represent the mean  $\pm$  SD

(n = 3). Data were as DCF Fluorescence/mg protein. \*  $P < 0.05$  compared with LPS group.

Figure 11 - Effect GA + LPS and LPS in the cytokines release. Cells were exposed to LPS (50 ng/mL) and different concentrations of GA. The cytokines IL-6 (A), IL-8 (B) and IL-1 $\beta$  (C) were analyzed. The data represent the mean  $\pm$  SD (n = 5). Data were expressed as pg/2x10<sup>5</sup> cells. \*  $P < 0.05$  compared with control group.

FIGURE 1

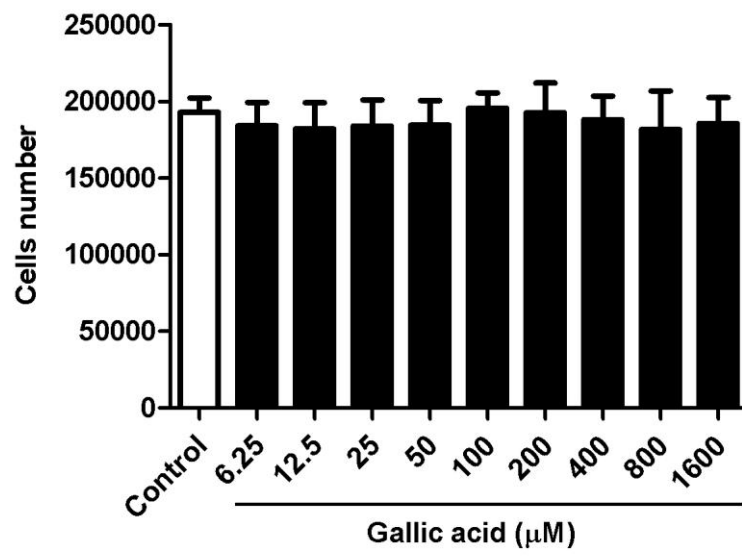


FIGURE 2

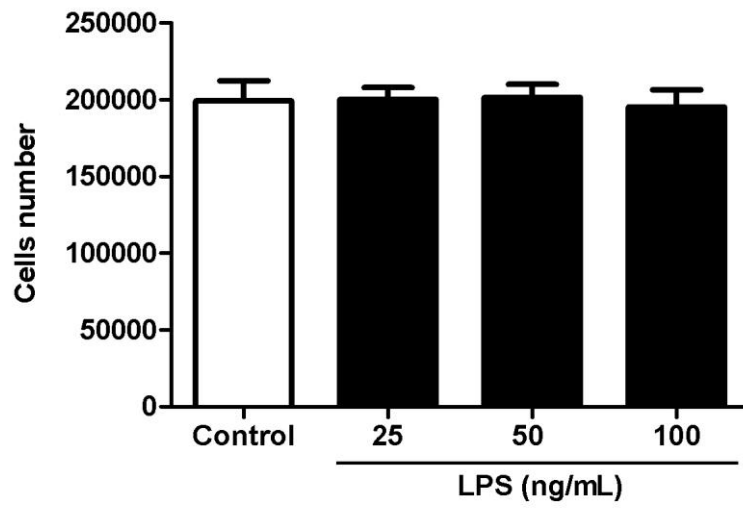




FIGURE 3

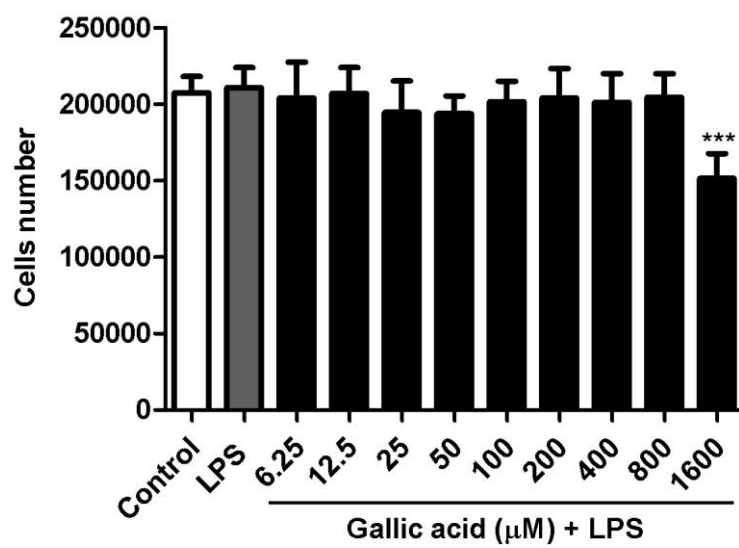


FIGURE 4

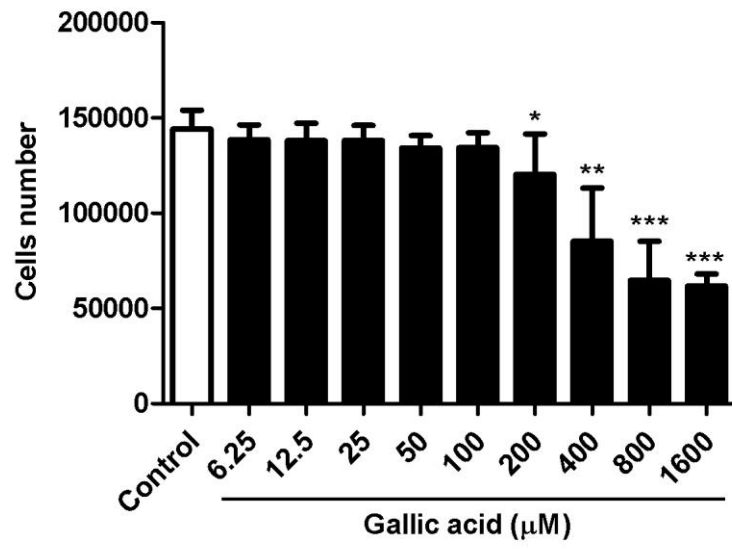


FIGURE 5

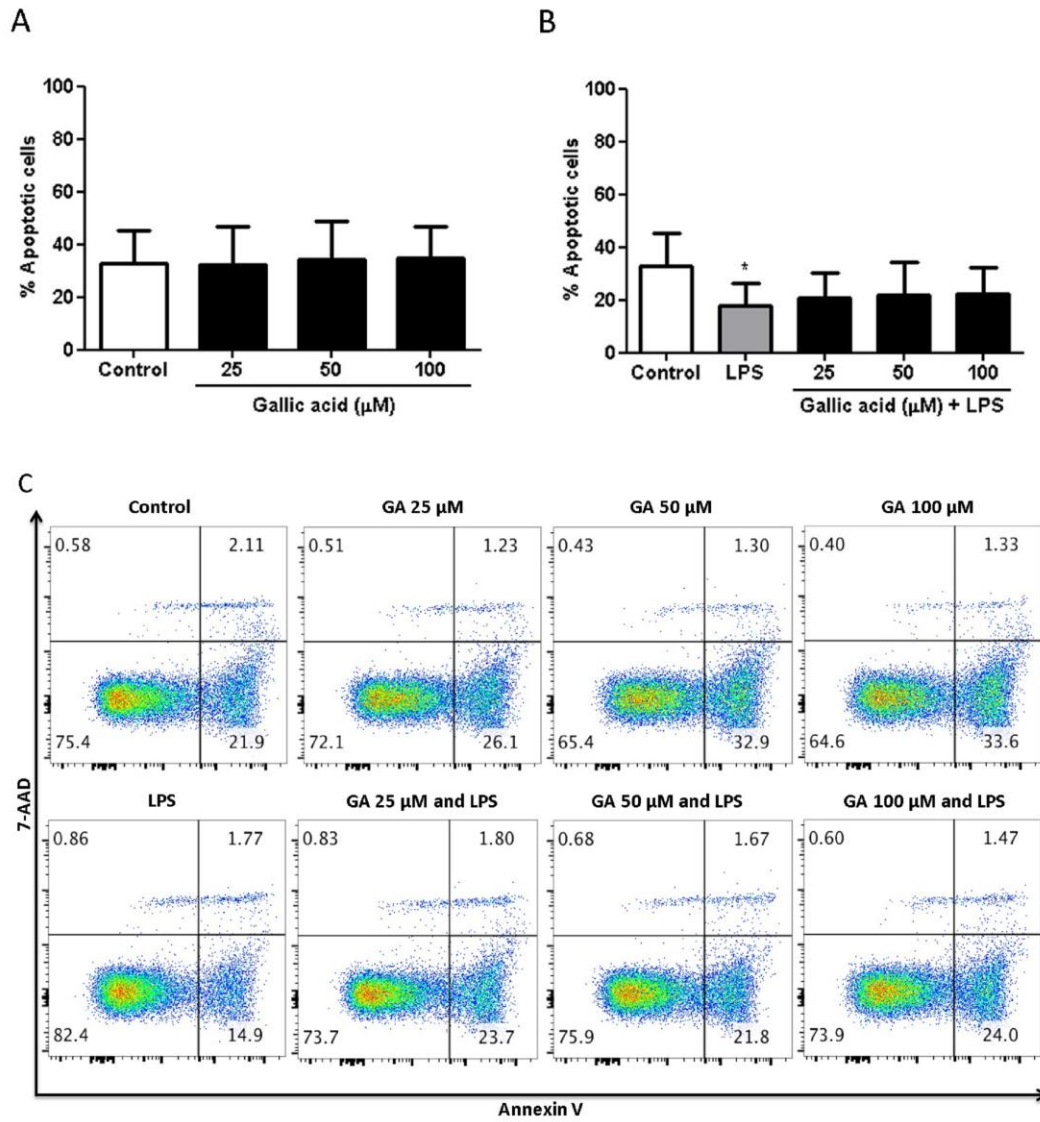


FIGURE 6 -

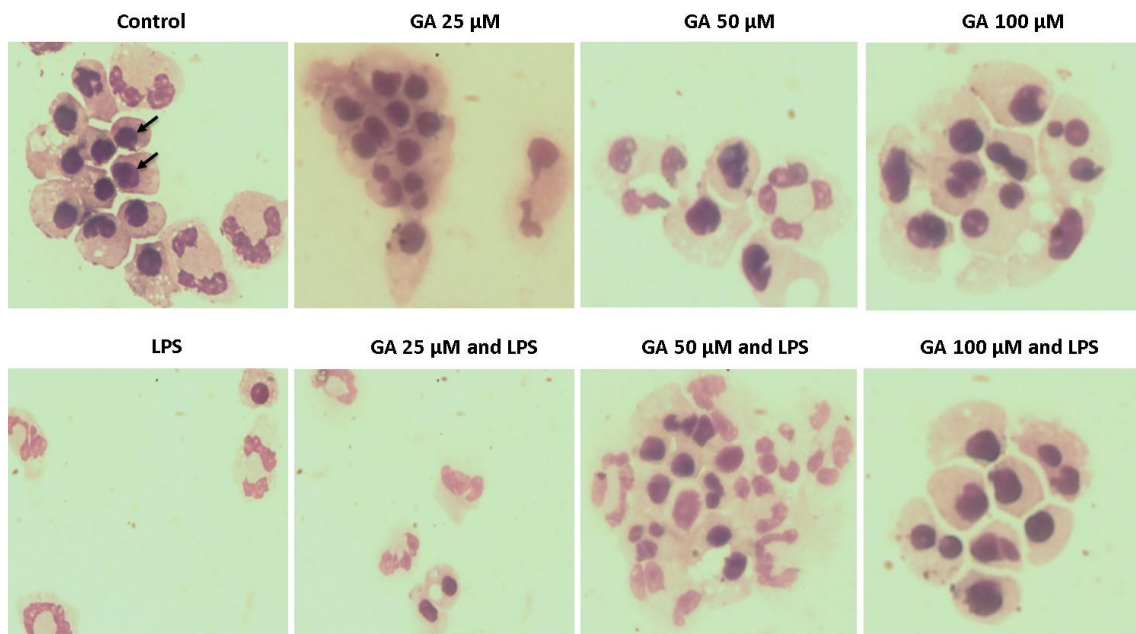


FIGURE 7

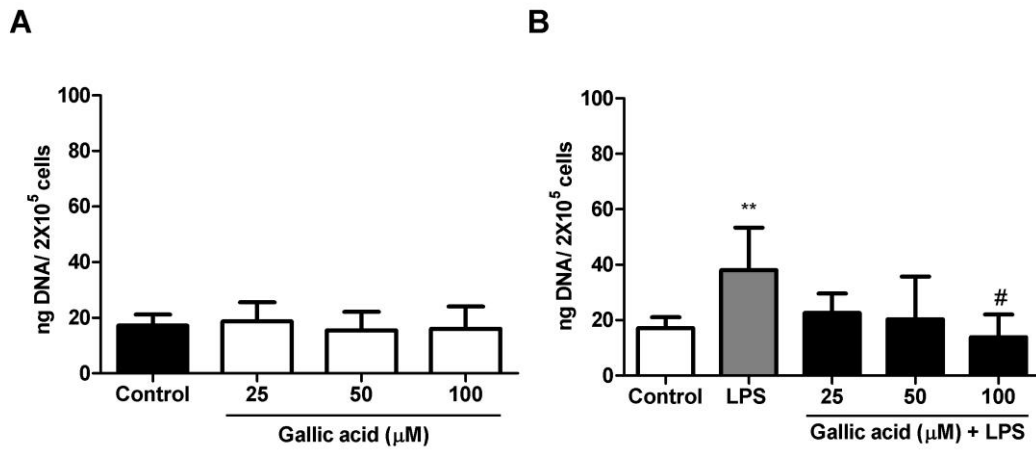


FIGURE 8

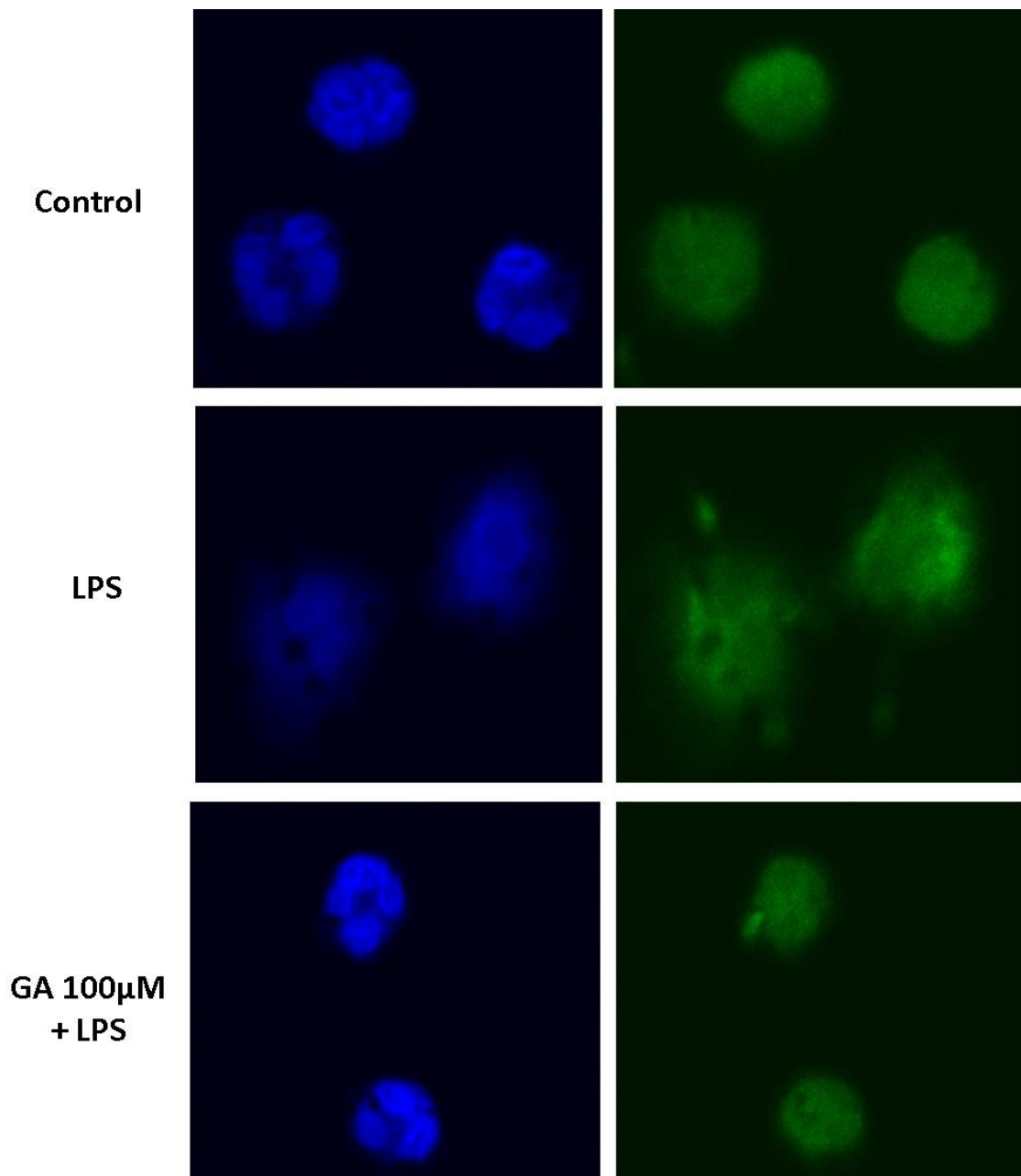


FIGURE 9

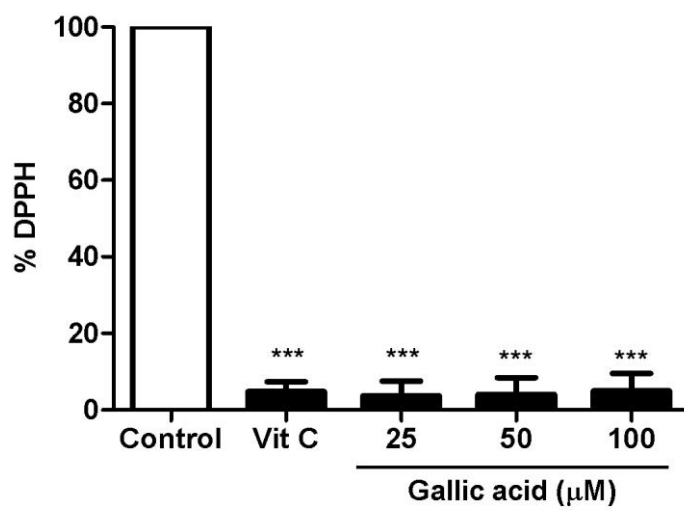
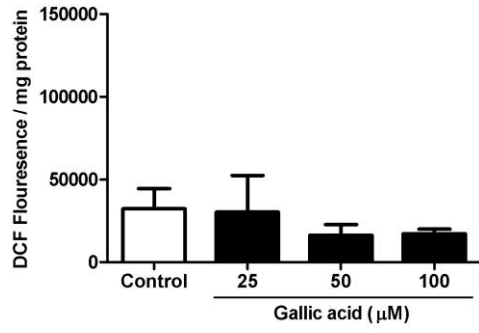


FIGURE 10

**A**



**B**

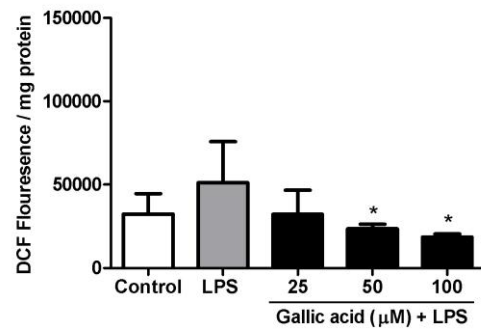
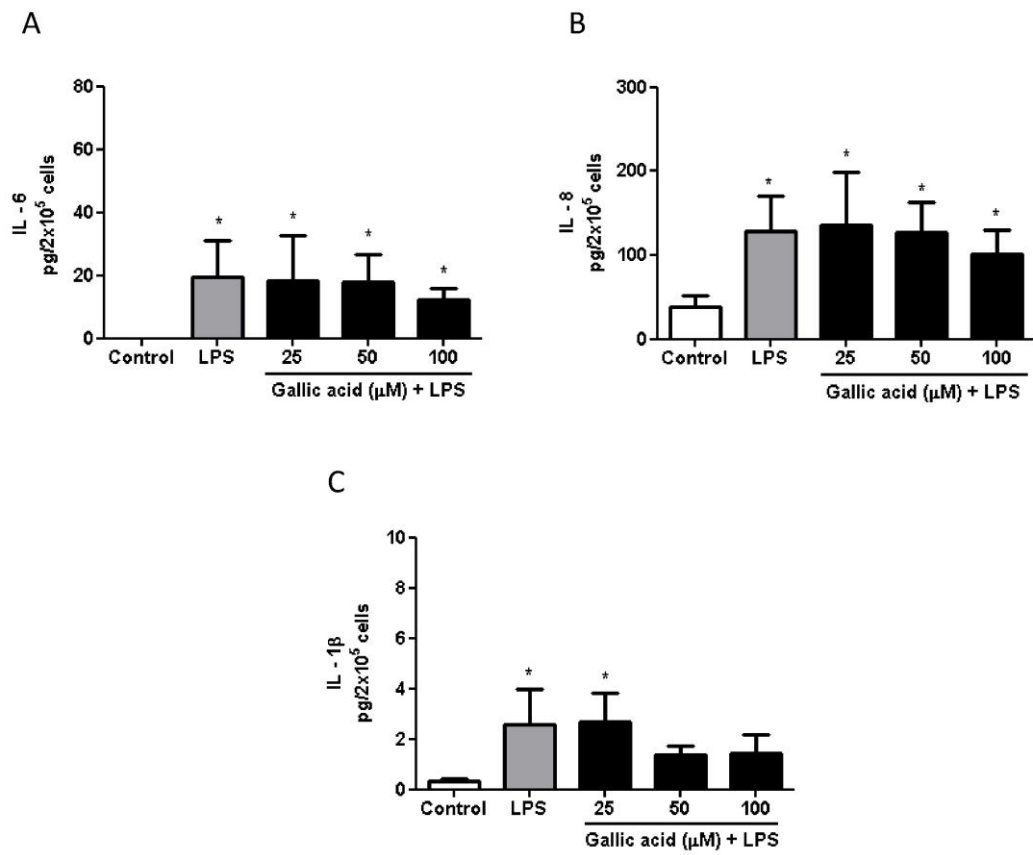




FIGURE 11



## **CAPÍTULO 3**

### **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A inflamação é um grave problema para os sistemas de saúde em todo o mundo. O número de casos de pessoas com doença inflamatória está cada vez maior, sendo assim novas drogas com poder de modular a resposta excessiva do hospedeiro estão sendo vistas como estratégias para mudar e melhorar os resultados dos tratamentos.

Conforme as ações descritas do AG, este estudo teve como objetivo avaliar o seu efeito no controle da apoptose e formação dos NETs de neutrófilos e na imunomodulação de células mononucleares, visando analisar seu possível efeito sobre a resposta inflamatória aguda e crônica. De acordo com os resultados encontrados, o AG demonstrou diminuir a ação do LPS sobre a apoptose e sobre indução dos NETs dos neutrófilos.

Nosso projeto previa a avaliação da imunomodulação do AG em células mononucleares de sangue periférico humano. Drogas que possuem efeito imunomodulador podem controlar a resposta do hospedeiro a patógenos, evitando uma reação exacerbada, conseqüentemente, reduzindo a hiperatividade imunológica. Realizamos experimentos e verificamos que o AG não possui este efeito (Figura 1), por esta razão, não prosseguimos com esta linha de investigação.

Conclui-se que o AG parece ser efetivo na resposta anti-inflamatória do indivíduo. Sabe-se que a inflamação é um problema mundial de alta incidência, portanto o tratamento que busca diminuir a resposta aguda excessiva é visto como uma alternativa terapêutica. Nossos resultados indicam que o AG pode ser uma alternativa importante como uma molécula terapêutica em doenças inflamatórias.

## 5.1 Resultados complementares

Figura 1

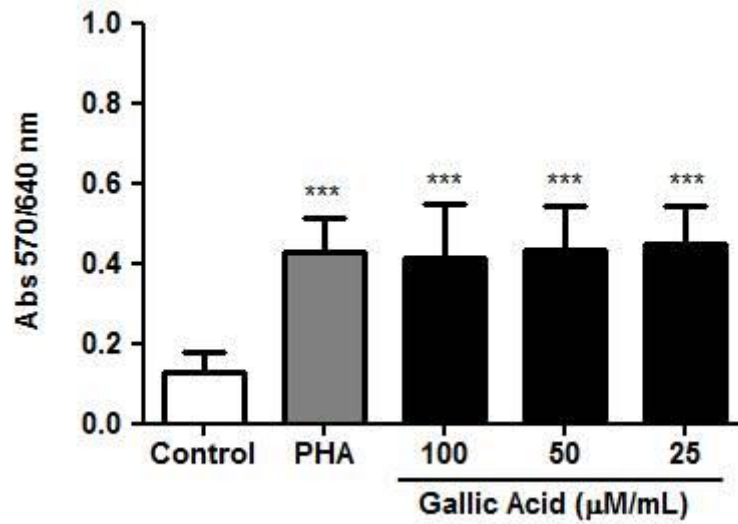


Figura 1 - Efeito do AG em células mononucleares estimuladas com fitohemaglutina (PHA). Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 5). Os dados foram expressos em absorbância. \*\*\*  $P < 0.001$  comparado com o grupo controle.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Bone, R.C., C.J. Grodzin, and R.A. Balk, *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process*. Chest, 1997. 112(1): p. 235-43.
2. Matot, I. and C.L. Sprung, *Definition of sepsis*. Intensive Care Med, 2001. 27 Suppl 1: p. S3-9.
3. Teixeira, C.F., et al., *Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2*. Toxicon, 2003. 42(8): p. 947-62.
4. Guimarães-Costa, A.B., et al., *ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death*. J Parasitol Res, 2012. p. 929743.
5. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. 176(2): p. 231-41.
6. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. 303(5663): p. 1532-5.
7. Vaughan, R.K., *Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor*, L. Stokes, Editor 2013: The Journal of Immunology. p. 8544-8553.
8. Liu, J., et al., *Induction of neutrophil death resembling neither apoptosis nor necrosis by ONO-AE-248, a selective agonist for PGE2 receptor subtype 3*. J Leukoc Biol, 2000. 68(2): p. 187-93.
9. Esmann, L., et al., *Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells*. J Immunol, 2010. 184(1): p. 391-400.
10. Mello, O.R., *N-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate: immunomodulatory effects on mononuclear cell culture*, A. Lunardelli, Editor 2012: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. p. 149-155.
11. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. 115(6): p. 457-69.
12. Thijs, L.G. and C.E. Hack, *Time course of cytokine levels in sepsis*. Intensive Care Med, 1995. 21 Suppl 2: p. S258-63.
13. Vilcek, J. and T.H. Lee, *Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions*. J Biol Chem, 1991. 266(12): p. 7313-6.
14. Radic, M., *Clearance of Apoptotic Bodies, NETs, and Biofilm DNA: Implications for Autoimmunity*. Front Immunol, 2014. 5: p. 365.
15. Sulowska, Z., et al., *Flow cytometric evaluation of human neutrophil apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants*. Mediators Inflamm, 2005. p. 81-7.
16. Meng, W., et al., *Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice*. Crit Care, 2012. 16(4): p. R137.
17. Zawrotniak, M. and M. Rapala-Kozik, *Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications*. Acta Biochim Pol, 2013. 60(3): p. 277-84.
18. You, B.R., et al., *Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion*. Mol Cell Biochem, 2011. 357(1-2): p. 295-303.
19. Chandramohan Reddy, T., et al., *Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-κB inactivation*. Toxicol In Vitro, 2012. 26(3): p. 396-405.
20. Eslami, A.C., et al., *Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study*. Chem Cent J, 2010. 4: p. 15.
21. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. 5(5): p. 415-8.

22. Wallach-Dayana, S.B., et al., *Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 290(4): p. L790-L796.

## 7. ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

**Pesquisador:** Jarbas Rodrigues de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 20648413.7.0000.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 443.648

**Data da Relatoria:** 31/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico" mostrou pendência no orçamento financeiro onde é citada a Bolsa de mestrado integral CNPq, cujo valor é de R\$ 22.178,00 reais. Porém, no anexo do planejamento orçamentário (itens a serem financiados) todos os itens colocam como fonte financiadora o Serviço. Esclarecer.

Situação: Pendência atendida.

#### Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico" mostrou pendência no orçamento financeiro onde é citada a Bolsa de mestrado integral CNPq, cujo valor é de R\$ 22.178,00 reais. Porém, no anexo do planejamento orçamentário (itens a serem financiados) todos os itens colocam como fonte financiadora o Serviço. Esclarecer.

Situação: Pendência atendida.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico" mostrou pendência no

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681

**Bairro:**

**CEP:** 90.619-900

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (513)320--3345

**Fax:** (513)320--3345

**E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 443.648

orçamento financeiro onde é citada a Bolsa de mestrado integral CNPq, cujo valor é de R\$ 22.178,00 reais. Porém, no anexo do planejamento orçamentário (itens a serem financiados) todos os itens colocam como fonte financiadora o Serviço. Esclarecer.

Situação: Pendência atendida.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico" mostrou pendência no orçamento financeiro onde é citada a Bolsa de mestrado integral CNPq, cujo valor é de R\$ 22.178,00 reais. Porém, no anexo do planejamento orçamentário (itens a serem financiados) todos os itens colocam como fonte financiadora o Serviço. Esclarecer.

Situação: Pendência atendida.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico" mostrou pendência no orçamento financeiro onde é citada a Bolsa de mestrado integral CNPq, cujo valor é de R\$ 22.178,00 reais. Porém, no anexo do planejamento orçamentário (itens a serem financiados) todos os itens colocam como fonte financiadora o Serviço. Esclarecer.

Situação: Pendência atendida.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendência atendida.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345

Fax: (513)320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 443.648

PORTO ALEGRE, 01 de Novembro de 2013

---

Assinador por:  
caio coelho marques  
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345

Fax: (513)320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

Página 03 de 03



## 8. ANEXO II - Termos de consentimento

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, Kelly Goulart Lima.....fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

|                           |                                                                                            |                   |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <u>Kelly Goulart Lima</u> | <u></u> | <u>08/01/2014</u> |
| Nome do Voluntário        | Assinatura do Responsável                                                                  | Data              |

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, João Albu b Tesmo, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

João Albu b Tesmo  
Nome do Voluntário

[Assinatura]  
Assinatura do Responsável

20/10/2014  
Data

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, Bianca Andrade Martha, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Bianca A. Martha

Nome do Voluntário



Assinatura do Responsável

11/02/2014

Data

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, ANDRÉ LUIZ VARGAS BRAGA fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

  
Nome do Voluntário

  
Assinatura do Responsável

26/02/2014  
Data

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, Paula Bacalco Caruso.....fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Paula Caruso  
Nome do Voluntário

[Assinatura]  
Assinatura do Responsável

12/03/2014  
Data

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, Juliana Rameu Marques, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Juliana Rameu Marques  
Nome do Voluntário

[Assinatura]  
Assinatura do Responsável

25/03/2014  
Data

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico

Gostaríamos de convidar o (a) senhor (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Efeito do ácido gálico no controle da apoptose de neutrófilos e imunomodulação de células mononucleares de sangue periférico". Os resultados deste projeto possibilitarão ao pesquisador obter dados sobre o possível efeito anti-inflamatório do ácido gálico. Para avaliarmos o efeito deste composto (ácido gálico) há a necessidade de coletar uma pequena quantidade de sangue do voluntário. Estas amostras de sangue serão analisadas pelos pesquisadores e de forma que nenhuma informação do voluntário será revelada na pesquisa, mantendo estas informações em sigilo. Serão expostos no estudo apenas dados e números.

Eu, Gabriele Catarina Krause.....fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos utilizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador responsável, e Gabriela Viegas da Silva, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais, e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações, sem qualquer tipo de prejuízo para a assistência do mesmo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (pesquisador responsável) no telefone (51) 3353-4147. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Gabriela Viegas da Silva, pelo telefone (51) 81376232. Posso Também ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone (51) 33203345 a fim de esclarecer qualquer dúvida.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Gabriele  
Nome do Voluntário

[Assinatura]  
Assinatura do Responsável

08/04/2014  
Data

## 9. ANEXO III - Comprovante de submissão do artigo


Submission Confirmation for Gallic acid reduces the effect of LPS on apoptosis and... Página 1 de 2

Gmail Mais

ESCREVER

INFO Online - Notícias - Amigo de Jobs relembra como era tomar LSD com o cofundador da Apple - Há 1 hora

**Entrada (461)**  
Com estrela  
Importante  
Enviados  
**Rascunhos (21)**  
Círculos  
Notes

 Pesquisar pessoas...  
Shanna Bitencourt  
Eduardo Caberlon  
adones.oliveira  
Adroaldo Lunardelli  
aga125  
amilcar.palmeira  
Ana Leticia Varga...  
atendimento  
dmelo@puers.br

**Submission Confirmation for Gallic acid reduces the effect of LPS on apoptosis and Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps** Entrada x

**Biochemical Pharmacology** BP@kumc.edu ppr\_eesmail.elsevier.com 12:16 (Há 7 minutos)  
para mim, gabiviegas22

inglês português Traduzir mensagem Desativar para: inglês

Dear Dr. Haute,


This is to confirm your manuscript files have been submitted to the editorial office via the on-line system. You will receive further correspondence within the next few days.

Thank you for choosing Biochemical Pharmacology.

Kind regards,  
Lynn LeCount  
Managing Editor  
Biochemical Pharmacology Editorial Office

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/answers/faq/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

 [Clique aqui para Responder](#), [Responder a todos](#) ou [Encaminhar](#)

<https://mail.google.com/mail/u/0/?pli=1>

26/01/2015