UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

LAMARTINE LEMOS DE MELO

Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre os neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados

Ribeirão Preto

2015

LAMARTINE LEMOS DE MELO

Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre os neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto

2015

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.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Melo, Lamartine Lemos de

Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre os neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados. Ribeirão Preto, 2015.

162p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Lucisano-Valim, Yara Maria.

1. Neutrófilo. 2. *Baccharis dracunculifolia*. 3. Ácido cafeico. 4. Mieloperoxidase 5. Metabolismo oxidativo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: MELO, Lamartine Lemos de

Título: Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre os neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados

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

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus por sempre renovar diariamente a minha fé, forças e saúde; me sustentado e suprimido todas as minhas dificuldades, com sua imensa bondade e poder; por nunca ter me abandonado e faltado com sua Palavra que, sempre consolou, alimentou e refrigerou a minha alma nos momentos de aflições e anseios. Por ter tomado diversos rumos na minha vida, e por ter me chamado para seguir e servir nessa bendita graça. À Ele sou imensamente grato por mais essa vitória e etapa vencida.

Aos meus amados pais, Elias e Simone, pelo imenso amor, carinho e dedicação. Por nunca desistirem de mim, não medindo esforços para sempre me ajudar e apoiar nos momentos mais difíceis e, por comemorado cada vitória alcançada. Obrigado por tudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Yara Maria Lucisano Valim pelo carinho, amizade, preocupação e a imensa dedicação de horas de discussões e correções durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelos valiosos conselhos e ensinamentos transmitidos, os quais muito somaram no meu crescimento pessoal e profissional, levando-nos sempre fizeram refletir e expandir as várias maneiras de enxergar e de se agir nos desafios e dificuldades postas em nossos caminhos. Através de ti renasceu a esperança de que ainda existem profissionais éticos e que é possível contruir um ambiente sério de pesquisa com muita paz, alegria e respeito ao próximo. E por fim, mas não menos importante, pela imensa oportunidade dada de realizar o sonho de fazer um curso de Pós-Graduação e por me integrar no seu grupo de pesquisa, no qual tive a chance de crescer e conhecer excelentes pessoas e profissionais.

À farmacêutica Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini pela agradável convivência, carinho, paciência e dedicação nas discussões de resultados e correções deste trabalho, por ser uma profissional que sempre esteve a disposição para inúmeros conselhos e auxílios técnicos desde os meus primeiros passos no laboratório. Saiba que muito aprendi contigo tanto no profissional e no pessoal, principalmente, ser um pouco menos ansioso. MUITÍSSIMO obrigado por tudo!

À Profa Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pelo carinho, respeito e conselhos dados durante agradáveis momentos de conversas, que tivemos na Cantina do Abreu e/ou no laboratório, que muitas das vezes também me fez expandir a maneira de agir e enxergar sobre as coisas desta vida.

Ao amigo Malson Neilson de Lucena pela hospitalidade em abrigar-me durante o período do processo seletivo do mestrado, pela preocupação com o andamento deste trabalho, por estar sempre disponível, principalmente, nos momentos de enfermidade e, pelas agradáveis convites de almoço e pelas vezes que saíamos para comer, conversar e dar boas risadas.

À minha amiga Vânia V.G. Oliveira dos Santos, pelo imensurável carinho, dedicação e preocupação que sempre teve/tem com a minha pessoa; por muitas das vezes ter assumido o papel de segunda mãe, dando ótimos conselhos, ensinamentos e também puxões de orelha; por sempre me receber tão bem em sua casa, enquanto residiu nessa cidade, com os braços sempre dispostos a dar um abraço e/ou com deliciosas refeições. Por não ter desistido desse carinho todo até mesmo ao ser tornar uma ‘madame canadense’

À Doutor Éverton de Oliveira Lima dos Santos por adotar diferentes papéis: amigo, um ‘segundo-pai’ e grande irmão na fé, pelas inúmeras conversas nos contextos religiosos, pessoais e profissionais; pelo imenso carinho e hospitalidade em todas e, incontáveis vezes, que estive na sua residência, onde guardarei memoráveis momentos comendo pão com mortadela ou assistindo vários filmes de desenho ao lado sua amada família. Por estar presente comigo do começo ao fim neste curso, mesmo estando milhas de distância.

À Doutora Ana Paula Landi Librandi pela amizade, pelas conversas sobre assuntos diversos, pelos desabafos, pelos inúmeros momentos de risadas e ‘gordices’ após almoço, e por ter convivido com um exemplo de excelente profissional.

À Doutora Larissa Fávaro Marchi pela amizade, pelas inúmeras e aventureiras caronas no ‘Marchi–Móvel’ até o refeitório universitário, pela agradável convivência tanto dentro e fora do ambiente de trabalho, aturando meus desabafos e dificuldades, e claro, sempre rindo nas minhas brincadeiras e piadas, muitas das vezes sem pinga de graça.

À doutorando Leandro Oliveira Bortot, do laboratório de Física Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), pelo excelente profissionalismo e execução das análises computacionais por docking, que muito vieram a somar com os resultados deste trabalho.

Ao doutorando Micássio Fernandes de Andrade por ter aceitado o convite de dividir um apartamento, sendo sempre uma pessoa de agradável convivência tanto no ambiente de trabalho quanto no residencial. Pela imensa paciência e seu incrível dom de ensinar o próximo, tendo repassados valiosas dicas em várias etapas deste curso (disciplinas, qualificação, curso de inverno) e, pelas grandes contribuições neste trabalho.

À doutoranda Andréa S.G. Figueiredo-Rinhel pela paciência em ensinar nos meus primeiros passos e experimentos do mestrado, pela agradável e divertidíssima convivência durante desenvolvimento deste trabalho.

À mestrande Camila Andresa Carvalho por ser uma pessoa de convivência agradável, por ensinar que há momentos que devemos desacelerar um pouco durante rotina laboratorial, e pelos deliciosos quitutes, que traziam boas energias durante os intervalos na ‘copinha’.

À mestrande Lucinéia Reuse Albiero que pelo tempo de convivência, por seu recém ingresso a Pós-Graduação, demonstra ser uma pessoa agradável, disposta sempre a aprender e dando indícios de grande potencial profissional.

À técnica Nadir Mazzucato, pelo auxílio na organização dos materiais do laboratório, pela atenção, cuidado e carinho de uma segunda mãe durante todo o período da Pós-Graduação, pelos momentos de descontrações durante o intervalo pós-almoço com aquele café indescritível e saboroso, que só ela sabe fazer.

À técnica Luciana Ceribelli pela amizade, pelos momentos de descontração e risos, que muito alegrou meu dia-a-dia vividos no laboratório.

Ao técnico Alcides Silva Pereira, pela amizade, paciência com as inúmeras brincadeiras e pela importante colaboração no preparo das soluções e organização dos materiais do laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Agnaldo Fernando Baldo da Silva, Ana Cristina Morseli Polizello, Ieda Maria Razaboni Prado e Luciana Ângulo pela agradável convivência e estarem sempre disponíveis nos auxílios e coselhos que muito contribuíram na execução dos experimentos deste trabalho.

À técnica Fabiana Rossetto de Moraes, pelo auxílio na execução dos experimentos e análise de resultados de citometria de fluxo, e claro, pela paciência com o ‘doido das 04h’ e os momentos de brincadeiras e risadas em todos horários marcados na agenda do citometro, disputados nas longas filas que se formava nas altas horas de madrugada.

À Ana Cristine S. Ferreira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP, pelo enorme paciência que tivesse comigo e inúmeros auxílios em todas as etapas do curso do mestrado, e pelo carinho, atenção e respeito demonstrado durante todos os auxílios, demonstrando ter essência de um ‘ser humano’, raridade nos dias atuais.

A todos os professores e alunos do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, pela convivência agradável.

A todos os funcionários da limpeza e da portaria Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, pela manutenção e ordem no ambiente de trabalho.

Aos voluntários que colaboraram na doação de amostras de sangue, sendo essenciais na execução deste trabalho de pesquisa.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho
(Processo n. 134641/2013-2).

RESUMO

MELO L.L. Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados. Dissertação [Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 162f.

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do hospedeiro, atuando na contenção e eliminação de patógenos. Contudo, alterações na vida média, no excessivo recrutamento e ativação dos neutrófilos estão associados a danos teciduais e a doenças inflamatórias e autoimunes. A modulação das funções efetoras dos neutrófilos pode auxiliar no tratamento de tais patologias. Neste sentido, os produtos naturais constituem uma importante fonte de novas substâncias imunomoduladoras. Um estudo recente demonstrou que, a inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos pelo extrato etanólico bruto das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) correlaciona-se com a proporção entre ácido cafeico (CaA) e outros compostos fenólicos contidos nesta amostra. Para dar prosseguimento à investigação do potencial imunomodulador do EEBBd e do CaA, os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito modulador desses produtos naturais: (i) em três funções efetoras de neutrófilos humanos - fagocitose, atividade microbicida e metabolismo oxidativo estimulado por agentes independentes de receptores (forbol-12-miristato-13-acetato; PMA) e dependentes apenas de receptores Fcγ (imunocomplexos não-opsonizados; IC) ou de receptores Fcγ associados a receptores do complemento (imunocomplexos opsonizados com complemento; IC-SHN); (ii) na atividade da mieloperoxidase (MPO); (iii) na expressão de receptores de membrana; (iv) e na captura (*scavenger*) de H₂O₂ e HOCl. O CaA foi mais efetivo do que o EEBBd em inibir a atividade da MPO e em capturar H₂O₂ e HOCl. A análise *in silico* revelou que o CaA bloqueia a entrada do sítio ativo da MPO através da interação com os resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239; os dois últimos resíduos são essenciais para clivar o H₂O₂ e para estabilizar o sítio ativo, respectivamente. A eficiência dos agentes utilizados para estimular o metabolismo oxidativo, medido por quimioluminescência dependente de lucigenina e de luminol, ocorreu na seguinte ordem: PMA > IC-SHN > IC. Embora o PMA tenha sido o agente mais efetivo em estimular o metabolismo oxidativo, ambas as amostras (EEBBd e CaA) inibiram com maior intensidade esta função celular estimulada por PMA do que a mesma função estimulada por IC-SHN e IC. Além disso, ambas, EEBBd e CaA, não alteraram os níveis de expressão dos receptores TLR2, TLR4, CD16, CD32, e CD11b/CD18. Nas maiores concentrações avaliadas, EEBBd (50 µg/mL) e CaA (90 µg/mL) não foram citotóxicos para os neutrófilos. O EEBBd inibiu intensamente a capacidade fagocítica e reduziu discretamente a capacidade microbicida dos neutrófilos frente à *Candida albicans*. Portanto, o CaA contribui para ação inibitória do EEBBd no metabolismo oxidativo e na atividade da MPO, mas não na capacidade fagocítica e microbicida de neutrófilos. Por fim, o efeito imunomodulador do CaA e do EEBBd não é mediado por alterações na viabilidade celular ou na expressão de receptores de membrana em neutrófilos. O conjunto de resultados obtidos pode auxiliar na elucidação do mecanismo de ação destes produtos naturais sobre as funções efetoras de neutrófilos, bem como no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas pela ativação exacerbada de neutrófilos.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, ácido cafeico, mieloperoxidase, neutrófilos, metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

MELO, L.L. Immunomodulatory action of caffeic acid, a secondary metabolite of *Baccharis dracunculifolia*, on human neutrophils activated by different stimuli stimulated by soluble and particulate agents. Dissertação [Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 162f.

Neutrophils represent the first line of host defense that acts in the containment and clearance of pathogens. However, changes in life span and excessive recruitment and activation of neutrophils are associated with tissue damage and inflammatory and autoimmune diseases. Modulation of the effector functions of neutrophils can help to treat these pathologies. In this sense, natural products constitute an important source of novel immunomodulating compounds. A recent study has demonstrated that the neutrophil oxidative metabolism inhibition by the crude ethanol extract of *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) leaves correlates with the ratio of caffeic acid (CaA) to other phenolic compounds that exist in it. To continue investigating the immunomodulating potential of EEBBd and CaA, the present study aimed to examine whether these natural products modulate: (i) three effector functions of human neutrophils – phagocytosis, microbial killing, and oxidative metabolism elicited by a receptor-independent stimulus (phorbol-12-myristate-13-acetate; PMA) and by receptor-dependent stimuli that bind Fc γ receptors alone (non-opsonized immune complexes; IC) or in combination with complement receptors (complement-opsonized immune complexes; IC-SHN); (ii) myeloperoxidase (MPO) activity; (iii) expression of membrane receptors; (iv) H₂O₂ e HOCl scavenging. CaA was more effective than EEBBd in inhibiting MPO activity and scavenging H₂O₂ and HOCl. The *in silico* analysis revealed that CaA blocks the entrance of the active site of MPO through the interaction with Gln-91, His-95, and Arg-239; the two last residues are essential to cleave H₂O₂ and stabilize the active site, respectively. The agents used to stimulate the oxidative metabolism, as measured by the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence assays, acted in the following ranking order of efficiency: PMA > IC-SHN > IC. Although PMA was the most efficient agent at stimulating the neutrophil oxidative metabolism, both samples (EEBBd and CaA) suppressed the PMA-induced oxidative metabolism more effectively than they suppressed the same cell function elicited by IC-SHN and IC. Both EEBBd and CaA did not alter the levels of TLR2, TLR4, CD16, CD32, and CD11b/CD18 receptors expression. At the highest concentrations tested, EEBBd (50 μ g/mL) and CaA (90 μ g/mL) were not toxic towards neutrophils. EEBBd strongly diminished the phagocytic capacity and slightly reduced the *Candida albicans* killing ability of neutrophils. In conclusion, CaA contributes to the EEBBd inhibitory action on the oxidative metabolism and MPO activity but not on the phagocytic capacity and microbial killing ability of neutrophils. Furthermore, the immunomodulating effect of CaA and EEBBd is not mediated by alterations in either cell viability or expression of membrane receptors in neutrophils. Together, the results can help to unravel the mechanism of action of these natural products on the effector functions of neutrophils, and to develop new drugs to treat inflammatory diseases mediated by neutrophil overactivation.

Key words: *Baccharis dracunculifolia*, caffeic acid, myeloperoxidase, neutrophil, oxidative metabolism.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABAH	Hidrazida do ácido 4-aminobenzoico
AF	Ácido fosfatídico
ANOVA	Análise de variância
C3aR	Receptor de anafilotoxina C3a
C5aR	Receptor de anafilotoxina C5a
C5L2	Receptor da anafilotoxina C5a <i>like</i> tipo 2
CD	Cluster de diferenciação
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% da resposta biológica
cpm	Fótons contados por minuto
CR	Receptor de complemento
CR1	Receptor de complemento tipo 1
CR2	Receptor de complemento tipo 2
CR3	Receptor de complemento tipo 3
CR4	Receptor de complemento tipo 4
CTLs	Receptores lectina tipo-C
CXCL	Quimiocina de motivo Cisteína-Aminoácido-Cisteína ligante (<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>)
CXCR	Receptores de quimiocinas do tipo C-X-C
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano celular
Dectin-1	Receptor de lectina-1 tipo C associado a célula dendrítica
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picril-hidrazil
EEBBd	Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
FcγR	Receptor para porção Fc de IgG
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	n-Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPR	Receptor para fMLP
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GPI	Glicosil-fosfatidil inositol
IC	Imunocomplexo de IgG íntegra e ovalbumina
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1

IC-SHN	Imunocomplexo de IgG anti-ovalbumina e ovalbumina, opsonizado com soro humano normal
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
ITAM	Motivo de ativação dependente de tirosina
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	Regiões ricas repetidas de leucinas
Mac-1	Antígeno de macrófago-1 (<i>macrophage-1 antigen</i>) ou CR3
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MIF	Intensidade mediana de fluorescência
MPO	Mieloperoxidase
MR	Receptor de manose
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NE	Elastase de neutrófilos
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos (<i>neutrophil extracellular trap</i>)
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMNs	Polimorfonucleares (neutrófilos)
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões moleculares
QLluc	Quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	Quimioluminescência dependente de luminol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHA	Ácido salicil-hidroxiâmico
SHN	Soro humano normal
Syk	Tirosina quinase do baço (<i>spleen tyrosine kinase</i>)
TIR	Domínio intracelular com região homóloga a do receptor de IL-1
TLR	Receptores homólogos a Toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
ZIops	Zimosan opsonizado
ZI-FITC	Zimosan marcado com FITC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Arquitetura básica de Toll e receptores Toll-like	25
Figura 1.2 -	Desenvolvimento dos neutrófilos e formação dos grânulos.....	36
Figura 1.3 -	Ciclos de cloração e peroxidação da mieloperoxidase e reações de formação dos compostos intermediários I e II.....	40
Figura 1.4 -	Esquema do ciclo de cloração da mieloperoxidase (MPO) e formação do composto I.	40
Figura 1.5 -	Esquema do ciclo de peroxidação da mieloperoxidase (MPO) e formação do composto II e restauração da forma nativa da enzima.....	42
Figura 1.6 -	A formação do composto I, II, e III nas etapas enzimáticas da MPO.	42
Figura 1.7 -	Classificação química dos compostos fenólicos.....	46
Figura 1.8 -	Estrutura química do ácido cafeico.....	47
Figura 3.1 -	Perfil cromatográfico de soro imune rico em IgG anti-OVA.	56
Figura 3.2 -	Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA.	57
Figura 3.3 -	Determinação do ponto de equivalência da reação entre OVA em diferentes diluições e IgG anti-OVA.	58
Figura 3.4 -	Estrutura do DPPH• antes e após a reação com compostos antioxidantes (AH).....	60
Figura 3.5 -	Curva padrão de HOCl	65
Figura 3.6 -	Esquema simplificado da produção de quimioluminescência pela reação MPO-H ₂ O ₂ -luminol	60
Figura 3.7 -	Representação simplificada da produção das principais EROs produzidas por neutrófilos estimulados, bem como da detecção das mesmas por meio de sondas quimioluminescentes (luminol e lucigenina), as quais são empregadas separadamente em procedimentos experimentais.....	70

Figura 3.8 - Representação das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade do EEBBd e do composto sintético ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos	71
Figura 4.1 - Efeito antioxidante dos compostos fenólicos sobre o radical livre do DPPH.....	77
Figura 4.2 - Ácido cafeico exibe um potencial scavenger do radical livre do DPPH dependente de concentração	78
Figura 4.3 - Ácido cafeico exerce efeito antioxidante sobre o ácido hipocloroso do que o EEBBd	80
Figura 4.4 - Ácido cafeico exerce maior efeito antioxidante sobre o peróxido de hidrogênio do que o EEBBd.....	81
Figura 4.5 - Ácido cafeico inibe mais a atividade enzimática da MPO do que o EEBBd.....	82
Figura 4.6 - Estrutura química dos ligantes empregadas no docking com a enzima MPO.....	83
Figura 4.7 - Modos de interação observados entre o ácido cafeico e a enzima MPO..	84
Figura 4.8 - Modos de interação observados entre o ácido <i>p</i> -cumárico e a enzima MPO.....	85
Figura 4.9 - Modo de interação observado entre o ácido ferúlico e a enzima MPO	85
Figura 4.10 - Modo de interação observado entre ácido <i>t</i> -cinâmico e a enzima MPO ..	86
Figura 4.11 - Modos de interação observados com os inibidores ABAH e SHA e a enzima MPO.	86
Figura 4.12 - EEBBd e ácido cafeico não exercem efeito sobre as sondas quimioluminescentes	89
Figura 4.13 - Análise do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com PMA, IC e IC-SHN.....	90
Figura 4.14 - Ácido cafeico apresenta um maior efeito inibitório na produção de ERO totais e de ânion superóxido de neutrófilos estimulados com PMA que o EEBBd	92

Figura 4.15 - Ácido cafeico apresenta somente maior inibição na produção de ERO totais de neutrófilos estimulados imunocomplexos (ICs) quando comparado ao EEbBd.....	94
Figura 4.16 - EEbBd apresenta maior efeito inibitório que o ácido cafeico somente na produção de ERO totais de neutrófilos estimulados com imunocomplexos opsonizados (IC-SHN).....	96
Figura 4.17 - EEbBd e seu metabólito secundário (ácido cafeico) inibem com mais eficiência o metabolismo oxidativo de neutrófilos desencadeado por estímulo independente de receptor	97
Figura 4.18 - EEbBd e o ácido cafeico não alteram os níveis de expressão dos receptores de membrana CD11b/CD18, CD32 (FcγRIIa) e CD16 (FcγRIIIb) em neutrófilos humanos.....	99
Figura 4.19 - Ácido cafeico reduz a expressão de TLR-2 em neutrófilos humanos	101
Figura 4.20 - EEbBd reduz fortemente a fagocitose dos PMNs, enquanto o ácido cafeico pouco altera essa função.....	102
Figura 4.21 - Apenas o EEbBd promove decréscimo na função de <i>killing</i> em neutrófilos humanos.....	104
Figura 4.22 - Visão geral da MPO humana.....	153
Figura 4.23 - Sítio ativo da mieloperoxidase-MPO	154
Figura 4.24 - Substâncias utilizadas como controle positivo de interação com a enzima MPO	155
Figura 4.25 - Complexo HX1-MPO.....	155
Figura 4.26 - Complexo SHA-MPO.....	156
Figura 4.27 - Complexo Quercetina-MPO	157
Figura 4.28 - Complexo de ligação do ácido cafeico ou ácido gálico com a MPO	158
Figura 4.29 - Comparação das poses obtidas para quercetina, ácido cafeico e ácido gálico	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Análise da capacidade de sequestrar o radical livre do DPPH pelo Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBBd) e ácido cafeico	78
Tabela 4.2 -	Análise do efeito scavenger de HOCl pelo Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBBd) e ácido cafeico	80
Tabela 4.3 -	Análise do efeito scavenger de H ₂ O ₂ pelo Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBBd) e ácido cafeico	81
Tabela 4.4 -	Viabilidade celular e atividade da enzima LDH resultantes do tratamento dos PMNs com Extrato Etanólico Brutos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBBd) referente ao mês de Maio/07	88
Tabela 4.5 -	Viabilidade celular e atividade da enzima LDH resultantes do tratamento dos PMNs com ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)	88
Tabela 4.6 -	Valores de CI ₅₀ obtidos pelos ensaios de quimioluminescência dependentes de lucigenina (LUC) e de luminol (LUM), por diferentes estímulos)	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Neutrófilos: características e funções gerais	23
1.2. Funções efectoras dos neutrófilos	24
1.2.1. Reconhecimento de patógenos.....	24
1.2.1.1. Receptores do tipo Toll (TLR)	24
1.2.1.2. Receptores de fragmentos do complemento (CR).....	27
1.2.1.3. Receptores para a porção Fc de imunoglobulinas da classe G (FcγRs)	29
1.2.1.4. Os sinais intracelulares mediados pelos receptores FcγR e CD11b/CD18.....	31
1.2.2. Fagocitose	34
1.2.3. Desgranulação	35
1.2.4. Metabolismo oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)	37
1.2.4.1. Mieloperoxidase (MPO): estrutura, ativação e seu envolvimento na produção de ERO de neutrófilos humanos.....	38
1.2.4.1.2. Propriedades estruturais e enzimáticas da MPO neutrófilos humanos	39
1.2.4.1.3. MPO na modulação de respostas imunes inflamatórias.....	43
1.3. A espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> De Candolle	44
1.4. Compostos fenólicos	45
1.4.1. Ácido cafeico	46
2. OBJETIVOS.....	49
2.1. Objetivo geral	50
2.2. Objetivos específicos.....	50
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
3.1. Reagentes.....	52
3.2. Indivíduos saudáveis (Aspectos éticos).....	53
3.3. Isolamento de neutrófilos	53

3.4. Preparação do Extrato Etanólico Bruto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBBd)	54
3.5. Obtenção do soro humano normal (SHN)	55
3.6. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos IgG anti-OVA.....	55
3.6.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA	55
3.6.2. Purificação de IgG a partir do soro imune	56
3.6.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	57
3.6.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo ..	57
3.7. Preparo dos estímulos	58
3.7.1. Preparo de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	58
3.7.2. Opsonização do Zimosan (ZIops).....	58
3.7.3. Marcação do Zimosan com FITC (ZI-FITC).....	59
3.7.4. Preparação dos imunocomplexos (ICs)	59
3.7.5. Opsonização os imunocomplexos (ICs)	60
3.8. ENSAIOS EM SISTEMAS NÃO-CELULARES	60
3.8.1. Avaliação da atividade antioxidante de algumas substâncias presentes no extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i> frente ao radical DPPH•	60
3.8.2. Análise do efeito <i>scavenger</i> de HOCl	61
3.8.2.1. Quantificação de HOCl na água sanitária doméstica.....	61
3.8.2.2. Avaliação do efeito <i>scavenger</i> de HOCl pelo ácido cafeico.....	63
3.8.3. Efeito das substâncias sobre a atividade <i>scavenger</i> de H ₂ O ₂	63
3.8.4. Avaliação da atividade inibitória da enzima mieloperoxidase pelas substâncias (EEBBd e ácido cafeico) empregando a reação MPO-H ₂ O ₂ -luminol	64
3.8.5. Avaliação da interação entre o ácido cafeico e a MPO por <i>docking</i> ...	66

3.9. ENSAIOS EM SISTEMAS CELULARES.....	66
3.9.1. Análise de morte de neutrófilos tratados com EEBBd e ácido cafeico: alteração de membrana por exclusão ao corante Azul de Tripan e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) - Necrose	66
3.9.2. Verificação de efeito “quenching” nas amostras EEBBd e ácido cafeico	68
3.9.3. Avaliação do efeito de diferentes estímulos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos: Ensaio de quimioluminescência (QL).....	68
3.9.4. Análise do efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e PMA.	69
3.9.5. Quantificação da expressão de receptores em neutrófilos tratados com EEBBd ou ácido cafeico.....	72
3.9.5.1. Receptores <i>CD11b/CD18 (CR3)</i>	72
3.9.5.2. Receptores <i>CD16 (FcγRIIIb)</i> e <i>CD32 (FcγRIIa)</i>	72
3.9.5.3. Receptores <i>CD282 (TLR 2)</i> e <i>CD284 (TLR 4)</i>	73
3.9.6. Avaliação do efeito do EEBBd e ácido cafeico sobre atividade fagocítica de partículas de zimosan (ZI).....	73
3.9.7. Atividade microbicida de neutrófilos, na presença de <i>Candida</i> <i>albicans</i> , pré-tratados com EEBBd ou ácido cafeico:	74
3.10. Análise estatística	74
4. RESULTADOS	75
4.1. ENSAIOS EM SISTEMAS NÃO-CELULARES	76
4.1.1. Atividade antioxidante dos compostos presentes em EEBBd de Maio/07 frente ao radical DPPH	76
4.1.2. Efeito do ácido cafeico sobre a atividade <i>scavenger</i> de HOCl e H ₂ O ₂	79
4.1.3. Análise da inibição da atividade peroxidativa da enzima mieloperoxidase (MPO) pelas substâncias (EEBBd e ácido cafeico) no sistema MPO-H ₂ O ₂ -luminol.....	81
4.1.4. Avaliação da interação da MPO com os compostos fenólicos presentes no EEBBd, por <i>docking</i>	83

4.2. ENSAIOS EM SISTEMAS CÉLULAS	87
4.2.1. Atividade citotóxica do EEBBd e do ácido cafeico sobre os neutrófilos – Avaliação pela exclusão ao Azul de Tripan e mensuração da atividade enzimática (LDH)	87
4.2.2. Efeito “quenching” do EEBBd e do ácido cafeico.....	89
4.2.3. Efeito de diferentes estímulos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos: Ensaios de quimioluminescência (QL).....	90
4.2.4. Avaliação do efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados.....	91
4.2.4.1. <i>Estímulo independente de receptores – PMA</i>	91
4.2.4.2. <i>Estímulo dependente de receptor $Fc\gamma R$ – Imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA)</i>	93
4.2.4.3. <i>Estímulo dependente de receptores $Fc\gamma R$ e CR– Imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA) opsonizado com soro humano normal (SHN)</i>	95
4.2.5. Análise quantitativa da expressão de receptores de membrana em neutrófilos tratados com EEBBd e ácido cafeico	98
4.2.5.1. <i>Expressão de CD11b/CD18 (CR3)</i>	98
4.2.5.2. <i>Expressão de CD32 ($Fc\gamma RIIa$) e CD16 ($Fc\gamma RIIIb$)</i>	98
4.2.5.3. <i>Expressão de CD282 (TLR-2) e CD284 (TLR4)</i>	100
4.2.6. Efeito do EEBBd e do ácido cafeico na fagocitose de zimosan por neutrófilos humanos	102
4.2.7. Efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre a atividade microbicida dos PMNs	103
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	124
APÊNDICE	153
ANEXOS	160

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neutrófilos: características e funções gerais

Os neutrófilos são as células sanguíneas da linhagem de glóbulos brancos, sendo as mais predominantes na população de células imunes no sangue humano (Kurzer et al., 2015). O desenvolvimento dos neutrófilos ocorre na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas em um processo denominado de granulopoiese, o qual inclui vários estágios de desenvolvimento como: promielócitos, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos de núcleo curvado (*band cells*) e, por fim, neutrófilos maduros, os quais deixam a medula e entram na circulação sanguínea (Baiton, Ullyot, Farquhar, 1971).

Os neutrófilos maduros são caracterizados por: *i*) seu núcleo segmentado, cujo atributo confere o nome alternativo – células polimorfonucleadas (PMNs); *ii*) pela presença de grânulos, que são constituídos por mais de 700 proteínas e *iii*) por seu tempo de meia vida curta, embora esta última característica é bastante debatida atualmente (Pillay et al., 2010, Rørvig et al., 2013; Tak et al., 2013).

Ao término da diferenciação, o balanço entre a retenção e liberação dos neutrófilos maduros na medula óssea é orquestrado pelas quimiocinas. A produção da quimiocina CXCL12 pelas células do estroma da medula se ligará ao receptor CXCR4 do neutrófilo, induzindo na retenção das mesmas. Em contrapartida, a liberação dos neutrófilos para circulação é principalmente mediada pela ligação desta quimiocina ao do CXCR2 (Martin et al., 2003). Além das quimiocinas (CXCL), outros fatores podem induzir a migração dos neutrófilos, tais como as citocinas (IL-8), fragmentos do complemento (C5a), leucotrieno B4 (LTB4) e proteínas formiladas de bactérias, como o *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Zakhireh et al., 1979; Phillipson; Kubes, 2011). Uma vez na corrente sanguínea, os neutrófilos reconhecem os primeiros sinais presentes células nas endoteliais, sobre as quais iniciará o rolamento (*rolling*) e extravasamento (diapedese) dos PMNs para o interior dos tecidos e/ou sítios inflamatórios, sendo este processo bem descrito e revisado por Borregaard, 2010; Kolaczkowska, Kubes, 2013.

Uma vez situados no sítio inflamatório e ao se depararem com partículas estranhas ou infecciosas, os neutrófilos iniciam um programa de *killing* antimicrobiano, envolvendo vários mecanismos como: o reconhecimento do patógeno, processo de fagocitose, a geração das espécies reativas de oxigênio (ERO), a desgranulação de grânulos intracelulares no interior dos fagossomos e a indução das armadilhas extracelulares de neutrófilo (do inglês, *neutrophil extracellular traps*: NETs) (Bardoel et al., 2014).

1.2. Funções efetoras dos neutrófilos

1.2.1. Reconhecimento de patógenos

Os neutrófilos são caracterizados como fagócitos profissionais e a primeira linhagem celular na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, como fungos e bactérias. Dessa maneira, essas células expressam uma gama de receptores de superfície celular para o reconhecimento da invasão de agentes patogênicos, bem como, do ambiente inflamatório.

Dentre esses receptores incluem: (i) os acoplados a proteína G (GPCRs) como: os receptores de peptídeos formilados (FPR); os de quimioatrantes (BLT1/2, PAFR, C5aR) e de quimiocinas (CXCR1/2 e CCR1/2); (ii) os de adesão, tais como integrinas e selectinas; (iii) vários receptores de citocinas; (iv) receptores imunes inatos de reconhecimento direto de patógenos, como toll-like (TLR) e os tipo lectinas-C (CTLs); (v) e os de reconhecimento indireto dos patógenos revestidos de opsoninas, como: os receptores para a porção Fc de IgG (FcγR) e os de complemento (CR) (Futosi et al., 2013).

Neste trabalho iremos delimitar a descrição estrutural e funcional dos TLRs, FcγR e CR, bem como, os sinais intracelulares e processos biológicos desencadeados pelos dois últimos receptores, que são os principais e essenciais na ativação das funções efetoras dos neutrófilos avaliadas neste trabalho.

1.2.1.1. Receptores do tipo Toll (TLR)

Os receptores do toll-like (TLRs) são uma família de receptores transmembrânicos conservados evolutivamente e, que apresentam alta homologia com o gene Toll na *Drosophila melanogaster* (Hashimoto et al., 1998). O primeiro homólogo de mamífero do receptor Toll de *Drosophila* foi identificado como hToll (agora denominado TLR4) por Medzhitov e colaboradores em 1997. Estudos posteriores identificaram várias proteínas que são estruturalmente relacionados com TLR4, e essas são conhecidas como receptores Toll-like (TLRs) (Takeda, Akira, 2015).

A estrutura dos TLRs é caracterizada por 03 domínios: um domínio N-terminal de reconhecimento ao ligante, um transmembrânico em α -hélice e um C-terminal citoplasmático e sinalizatório (Bell et al., 2003).

O domínio de reconhecimento (também conhecido como ectodomínio) dos TLRs é voltado para exterior de membrana celular ou para o lúmen dos endossomos, onde se

encontram os patógenos. O ectodomínio desses receptores é composto por glicoproteínas com 550-800 resíduos de aminoácidos, sendo presente blocos de 19 à 25 cópias contínuas de motivos/regiões repetitivos ricos em leucina (LRRs) (Kobe, Kajava, 2001; Bell et al., 2003).. Os receptores toll-like de mamíferos têm um apenas único bloco de LRRs, enquanto o Toll de *Drosophila* é ligeiramente diferente, contendo dois blocos distintos de LRRs (Bell et al., 2003; Gay, Gangloff, Weber, 2006 – **Figura 1.1**).

Figura 1.1: Arquitetura básica de Toll e receptores Toll-like. Diagrama esquemático dos receptores Toll (A) e os receptores de tipo Toll (B), mostrando os domínios extracelular, transmembrânico e citoplasmáticos dos receptores. Note-se que Toll de *Drosophila* tem dois blocos independentes de repetições ricas em leucina (LRRs) no domínio extracelular (ectodomínio). Ilustração retirada de Gay, Gangloff, Weber, 2006.

Já o domínio citoplasmático é descrito como pequena estrutura globular denominado de domínio de receptor de IL-1-Toll (TIR), devido a homologia com os domínios de sinalização dos membros da família dos receptores de IL-1 (IL-1R's) (O'Neill, Bowie, 2007). É nesse domínio citoplasmático onde serão recrutadas as moléculas adaptadoras, que iniciaram o processo sinalizatório desses receptores (Beg, 2002; O'Neill et al., 2003).

Os receptores Toll-like (TLRs) são membros representantes da classe de receptores de reconhecimento padrão molecular (PRRs), sendo específicos para o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além disso, os TLRs também são capazes de detectar moléculas endógenas denominadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Medzhitov, 2007; Prince et al., 2011).

Com a recente descoberta do TLR13 murino (Shi et al., 2011), têm sido descritos 13 TLRs em mamíferos, sendo 10 membros identificados em seres humanos (TLR1 ao TLR10) e doze em camundongos (TLR1 ao TLR9, e TLR11 ao TLR13) (Takeda, Akira, 2015).

Cada TLR reconhece um subconjunto específico de ligantes (ou PAMPs) derivados de vírus, bactérias, protozoários e fungos (revisto em Akira, Takeda, 2004; Takeda, Akira, 2015). Exemplo disso o TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Akashi-Takamura, Miyake, 2008). Já os TLR1, TLR2 e TLR6 detectam lipoproteínas bacterianas (Goh, Midwood, 2012).

A expressão de TLRs em diferentes tipos de células pode ser um importante mecanismo de regulação da resposta imune inata de vários agentes patogênicos. Trabalhos científicos com citometria de fluxo têm demonstrado a expressão constitutiva de TLR em várias células, especialmente leucócitos (Flo et al., 2001; Zarembek et al., 2002; Parker et al., 2005). Além disso, localização subcelular dos TLRs está relacionada a natureza dos seus ligantes patogênicos: os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 são expressos na superfície da célula, bem como intracelularmente, onde podem ser recrutados para fagolisossomos (Underhill et al., 1999; Parker et al., 2005). Já a expressão dos TLR3, TLR7, TLR8, e TLR9 é localizada predominantemente em compartimentos intracelulares (endossomos), onde esses receptores reconhecem ácidos nucleicos virais e/ou bacterianas (Heil et al., 2003; Matsumoto et al., 2003; Ahmad-Nejad et al., 2002). A função exata do TLR10 permanece inexplorada. (Guan et al., 2010).

Neutrófilos humanos expressam RNA mensageiros para todos os TLRs, exceto o TLR3 (Hayashi et al., 2003). Dentre todos os TLRs, os TLR2 e TLR4 são os mais estudados em neutrófilos, mediando respostas imunes à bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. TLR2 pode formar um heterodímero com TLR1 para detectar peptídeos triacilados ou TLR6 para reconhecer peptídeos diacilados. Por outro lado, o TLR4 reconhece o componente lipídeo A de lipopolissacarídeos (LPS) (Takeda et al., 2002). Além disso, os neutrófilos também expressam co-receptores TLR, incluindo CD14 e CD11b/CD18, os quais cooperam com TLR-4 ou TLR2 na membrana plasmática (Sabroe et al., 2002; Chow et al., 1999; Perera et al., 2001).

Além do reconhecimento de PAMPs bacterianos, os TLRs também estão incluídos na família de PRRs responsáveis na detecção de padrões moleculares de fungos. E ao contrário de vários antígenos, não existem PAMPs individuais e específicos para uma única espécie de *Candida*, contudo são compartilhados entre diferentes espécies e gêneros de fungos (Naglik, 2014). Os principais PAMPs fúngicos são aqueles associados a parede celular, que incluem os β -glucanas, *N*- e *O*-mananas, e fosfolipomananas (Netea et al., 2008). O reconhecimento dos diferentes polissacarídeos fúngicos, e em particular da *Candida albicans*, envolve o TLR2

(fosfolipomananas), TLR4 (*O*-mananas), receptores de manoses (MR) (*N*-mananas), e pela dectin-1 (β -1,3 glucano) (Netea et al., 2008; Roeder et al., 2004; Jouault et al., 2003; Brown 2002). Notavelmente, esses receptores (PRRs) podem atuar independentemente ou conjuntamente com outros. Exemplo disso é atuação sinérgica de TLR2 e Dectin-1 para reconhecer leveduras fúngicas, com dectin-1 induzindo a fagocitose enquanto TLR2 induz a produção de citocinas. Dectin-1 também sinergiza na sinalização com TLR4 (Netea et al., 2006; Ferwerda et al., 2008; Dennehy et al., 2009).

A ativação dos TLRs de superfície celular promove um amplo e múltiplos efeitos sobre os neutrófilos, incluindo: pré-ativação celular (*'priming'*); a ativação de fatores nucleares (como NF- κ B); secreção de citocinas (ex: IL-8) e quimiocinas; biossíntese de substâncias vasoativas; geração de espécies reativas de oxigênio (ERO); elevação da desgranulação; aumento da expressão de receptores (ex: CD11b/CD18); regulação a quimiotaxia com a redução de receptores CXCR1/2 e IL-8R; e o retardo da morte por apoptose por dependência de TLR4 e co-cultura com monócitos (Hayashi et al., 2003, Remer et al., 2003; Asehnoune et al., 2004; Lotz et al., 2004; Sabroe et al., 2003, 2005, Parker et al., 2005; Hattermann et al., 2007).

1.2.1.2. Receptores de fragmentos do complemento (CR)

O sistema complemento (SC) é um importante sistema de detecção de perigo, reconhecendo e sinalizando patógenos, e contribuindo na eliminação desses intrusos. Além de promover a destruição lítica de microrganismos pelo complexo de ataque de membrana, o SC desempenha um papel na regulação das respostas imunes inatas e adaptativas, envolvendo: o reconhecimento e eliminação de células apoptóticas e/ou debris, regeneração tecidual, angiogênese, direcionamento de leucócitos sanguíneos para o sítio da inflamação, indução da liberação de grânulos e geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pelos leucócitos da linhagem mielóide, incitação da fagocitose, a solubilização e *clearance* de imunocomplexos da circulação, e indução de respostas primárias ao antígeno em células B (Karsten, Köhl, 2012; Köhl, 2006; Leslie, 2001).

Todas essas ações são exercidas através da interação da ativação dos produtos dos complementos (C1, C3 ou C5) com seus específicos receptores. Esses receptores podem ser divididos em três categorias: (i) os de reconhecimento das anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a), sendo esses os: C5aR, C3aR e C5L2; (ii) os de ligação aos fragmentos ativos do C3, o C3b, e

os produtos de sua degradação, iC3b e C3dg, incluindo os CR1, CR2, CR3 e CR4; (iii) e os receptores para a molécula C1q. Dentre esses receptores listados, os neutrófilos expressam todos, exceto CR2 (Leslie, 2001; Ross, 2002).

O receptor de complemento do tipo 3 (CR3), também denominado de Mac-1 ou CD11b/CD18, é descrito com uma integrina expressa principalmente em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e monócitos/macrófagos, mas também encontrada em células dendríticas foliculares, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e plaquetas (Leslie, 2001; Zipfel, Skerka, 2009).

As integrinas são moléculas de adesão constituídas por subunidades alfa e beta associadas não covalentemente, que medeiam contato célula–célula, célula–matriz extracelular e as interações das células com organismos patogênicos. Até o momento, já foram descritos em células humanas 18 diferentes subunidades alfa e oito subunidades beta, as quais se combinadas resultam 24 diferentes heterodímeros, que podem se ligar a uma grande variedade de ligantes (Hynes, 1992, 2002; Shimaoka, Takagi, Springer, 2002). Descritas como glicoproteínas transmembrânicas heterodiméricas, as integrinas da família $\beta 2$ são as mais importantes expressas em leucócitos, sendo formadas pelas subunidades $\beta 2$ (CD18) e α (CD11) (Schymeinsky, Mócsai, Walzog, 2007). Exemplo dessas integrinas são, o LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha L\beta 2$) presente em todos os leucócitos circulantes, enquanto o CR3 (CD11b/CD18, MAC-1; $\alpha M\beta 2$) expresso na superfície de neutrófilos, monócitos e macrófagos (Futosi et al., 2013).

O receptor de complemento do tipo 3, além de ser constituído pela subunidade αM (CD11b) e pela $\beta 2$ (CD18), também possui dois diferentes sítios de ligação: o domínio “I” (inserção) e o sítio *lectina-like*. O domínio I, situado na região N-terminal do CD11b, é responsável pelo reconhecimento de proteínas da matriz extracelular, o componente C3bi do complemento, e moléculas de adesão intracelular (ex: ICAM-1). Já o sítio *lectina-like*, situado mais na região C-terminal da porção extracelular do CD11b, é o domínio de reconhecimento de carboidratos, como β -glucanos encontrados normalmente como um componente estrutural das paredes celulares dos fungos, como a *Candida albicans*. (Li et al., 2011; O’Brien et al., 2012). Diferentemente dos receptores de reconhecimento de padrões da *Candida* (Dectin-1 e TLRs), o Mac-1 (CR3) em neutrófilos circulantes necessita de sinais intracelulares engatilhados por outros receptores, para sua ativação e engajar com seus ligantes (Hynes, 2002). Exemplo disso, é o receptor de β -glucano Dectin-1, que promove ativação do CR3

mediante as proteínas Vav (fatores de câmbio para as RhoGTPases), para que o último receptor exerça o *clearance* da *C. albicans*. (Li et al., 2011).

Além de reconhecer a superfície de patógenos e células apoptóticas recobertas pelo fragmento C3bi do complemento, o receptor CR3 (CD11b/CD18) ativado é responsável em neutrófilos pela migração e acúmulo dessas células no sítio inflamatório; na ativação da fosfolipase D (PLD) e da tirosina kinase Syk; em desencadear a polimerização da actina e reorganização do citoesqueleto; fagocitose; desgranulação; produção de espécies reativas de oxigênio ERO, as NET's (juntamente com receptor CD16) e regulação da sobrevivência dos neutrófilos (mediante propagação de sinais antipoptóticos pela PI3K e Akt) (Lucisano, Mantovani, 1988; Fallman et al., 1993; Zhou, Brown, 1994; Okuro et al., 1995; Serrander et al., 1996; Berton; Lowell, 1999; Whitlock et al., 2000; Xia et al., 2002; Mócsai et al., 2002, Behnen et al., 2014)

1.2.1.3. Receptores para a porção Fc de imunoglobulinas da classe G (FcγRs)

Os FcγRs são os que reconhecem e se ligam ao fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina da classe G (IgG). Durante as etapas iniciais de uma infecção, a agregação dos FcγRs promove a internalização dos imunocomplexos e/ou de partículas opsonizadas com IgG, culminando vários eventos biológicos como: fagocitose, desgranulação com a liberação de proteases, ativação de metabolismo oxidativo e da secreção de citocinas (Dai et al., 2009).

De modo constitutivo, os neutrófilos humanos expressam duas classes de FcγRs: o FcγRIIa (CD32) e FcγRIIb (CD16) (Witko-Sarsat et al., 2000; Nimmerjahn, Ravetch, 2006). Contudo, uma terceira classe desse receptor - o FcγRIa (CD64) - também pode ser expresso nessas células de forma induzida por estimulação por G-CSF (Repp et al., 1991). Essas três classes de receptores se diferenciam no nível de expressão e na estrutura e, por consequência, na sua afinidade pela IgG (Dai et al., 2009).

O FcγRIa (CD64) é considerado um receptor de alta afinidade, isto é, reconhece a forma monômera de IgG₁ e/ou IgG₃, enquanto interage fracamente com IgG₄ e IgG₂ (Gessner et al., 1998; Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005). Essa grande afinidade se deve a presença de um terceiro domínio *Ig-like* na região extracelular do receptor, cujo domínio extra não é observado nas outras duas classes destes receptores (Flesch, Neppert, 2000). Ainda no contexto estrutural, este receptor possui domínio transmembrana e domínio citoplasmático, sendo que neste último, os domínios de motivo de ativação de imuno-receptor baseado em

tirosina (ITAMs) são ausentes. Desse modo, o sinal intracelular promovido pelo Fc γ RIa é desencadeado pela associação da cadeia α do receptor com a cadeia γ (homodímero) a qual, por sua vez, possui os ITAMs nos seus domínios citoplasmáticos (Letourneur et al., 1991).

O Fc γ RIIa (CD32) é dito, por sua vez, como um receptor de baixa afinidade, isto é, liga-se com baixa especificidade as IgGs monoméricas, porém reconhece com alta especificidade as IgGs complexada com o antígeno, ou seja, na forma de imunocomplexos (ICs). A preferência na ligação do CD32 é pelos ICs formados por IgG₃ seguidos pelos os de IgG₁ e, com menos afinidade, por IgG₂ e IgG₄ (Gessner et al., 1998, Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005). O CD32, diferentemente do CD64, possui seu próprio domínio ITAM, que será alvo de fosforilação pelas quinases da família Src, as quais iniciaram uma cascata de sinalização nos neutrófilos culminando a eventos como: elevação de moléculas livres de cálcio citosólico, ativação da NADPH oxidase, polimerização da actina e secreção de grânulos (Rollet-Labelle et al., 2004; Mayadas et al., 2009; Dai et al., 2009; Nordenfelt, Tapper, 2011).

O Fc γ RIIIb (CD16), do mesmo modo que o CD32, é um receptor de baixa afinidade ligando-se com mais especificidade aos ICs formados por IgG₁ e/ou IgG₃, e com baixa ligação para IgG₄ e IgG₂ (Kimberly, Salmon, Edberg, 1995; Gessner et al., 1998; Marzocchi-Machado, Lucisano-Valim, 2005). O CD16 de neutrófilos humanos é o único dentre as outras duas classes de Fc γ R, que não possui o domínio transmembrânico e citoplasmático, se fixando na membrana dessas células por uma âncora de glicosil-fosfatidil inositol (GPI) (Selvaraj et al., 1988). Embora o CD16 não detenha a cauda citoplasmática com os domínios de ativação (ITAMs), sabe-se que a ativação desse receptor induz a geração transiente de cálcio, polimerização de actina, secreção de grânulos sem ativação da NADPH oxidase (Edberg et al., 1992; Huizinga et al., 1990).

É de suma importância ressaltar, que o nível de expressão de Fc γ RIIIb (CD16) é predominante nos neutrófilos (100.000 à 200.000 molécula/célula) quando comparado ao Fc γ RIIa (CD32) (10.000 à 20.000 molécula/célula) (Tosi, Berger, 1988; Unkless et al., 1995; Nimmerjahn et al., 2006). Essa diferença no número de cópias tem sido justificado pela ação conjunta entre os receptores, a qual será descrita a seguir.

1.2.1.4. Os sinais intracelulares mediados pelos receptores Fc γ R e CD11b/CD18

O reconhecimento de ICs pelos neutrófilos é mediado pela ação conjunta do CD16 e CD32 cabendo ao primeiro receptor a função inicial, devido ao maior número de cópias, de capturar e concentrar os aglomerados de ICs sobre a membrana, enquanto o segundo é responsável em desencadear a sinalização intracelular via fosforilação de tirosina (Kimberly, et al., 1990; Brunkhorst et al., 1992; Vossebeld et al., 1997; Chuang et al., 2000).

A maioria, ou se não todos, os receptores que são proteínas transmembrânicas medeiam a transdução de sinal através da perturbação direta da bicamada lipídica (Naccache, 2013). Do mesmo modo, uma vez os ICs ligados e reconhecidos pelo CD32 inicia-se a primeira etapa da sinalização, a qual consiste na fosforilação dos domínios ITAMs presentes na cauda citoplasmática deste receptor. O ITAM é caracterizado por uma sequência curta de peptídeos que contém dois resíduos de tirosina, os quais são alvos de fosforilação para promover o recrutamento de proteínas quinases e fosfolipases (Mócsai et al., 2010). Ainda não está esclarecido completamente o mecanismo que desencadeia a fosforilação dos ITAMs dos receptores Fc e as proteínas quinases envolvidas, contudo sabe-se que a participação das tirosinas quinase da família Src é essencial para esse processo em células T e B, enquanto o papel dessa família de quinases é pouco compreendido em neutrófilos, devido a ausência de estudos de sinalização em neutrófilos deficientes de quinases da família Src (Futosi et al., 2013).

Após a fosforilação dos domínios ITAMs, dois resíduos de tirosinas fosforilados se tornam alvos do recrutamento e ligação de quinases da família Syk, a qual constitui em dois membros: Syk (presentes em diversas células hematopoéticas) e Zap-70 (envolvida na sinalização do receptor de células T). A ligação da Syk com os ITAMs ocorre através interação dos dois domínios SH dessa quinase com as duas tirosinas fosforiladas no ITAM, culminando na ativação da Syk (Mócsai et al., 2010). Uma vez ativada, os domínios SH2 e SH3 desta quinase se tornam sítios-alvos de ligação a regiões ricas em prolina e fosfotirosina, respectivamente, possibilitando a sua interação com outras moléculas envolvidas na sinalização celular, tais como as GTPases, a PI3K, e a PLC (Kwiatkowska et al., 2003; Mócsai et al., 2010; Kulkarni et al., 2011; Zarbock; Ley, 2011).

A proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) está relacionada na regulação de respostas funcionais de neutrófilos humanos. Dentre as múltiplas PI3Ks, a classe I das PI3Ks (com as subclasses IA e IB) são as diretamente relevantes nos eventos iniciais de ativação

dessas células (Andrews et al., 2007; Hawkins et al., 2006). Uma das funções desta quinase em neutrófilos é regular a fosforilação da proteína quinase B (Akt), das MAPK's (ERK e p38) e da fosfolipase C (PLC), quando tais células são estimuladas com fMLP ou IC (Tilton et al., 1997; Chen et al., 2003; Jakus et al., 2004). Além disso, a PI3K também é responsável pela transformação do fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), cujo processo de fosforilação dos fosfoinositóis é observado em células estimuladas via receptores de membrana como: o FcγR e o FPR (Paez; Seller, 2003; Chen et al., 2003). Desse modo, os efeitos desencadeados pelas ações destas quinases refletem nos processos de adesão, de quimiotaxia e recrutamento, da fagocitose e da atividade bactericida, principalmente, através da regulação da montagem e ativação do complexo NADPH oxidase, nos neutrófilos (Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000)

A fosfolipase C (PLC) é uma proteína solúvel localizada principalmente no citosol e se transloca para a membrana plasmática, através da fosforilação de resíduos mediado pelas quinases das famílias Src e Syk, durante a ativação de neutrófilos por receptores FcγR e β2 integrinas (como CD11b/CD18) (Jakus et al., 2009). Essa enzima é responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), culminando na formação de dois mensageiros secundários: DAG (diacilglicerol) e o IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato). O papel do primeiro mensageiro é mediar a ativação da PKC, enquanto o segundo direciona a liberação de cálcio de organelas intracelulares de estocagem, que também contribuirá para ativação da PKC (Fukami et al., 2010). Dentre as seis classes de isoformas desta enzima, os neutrófilos expressam as classes de PLCβ e γ, sendo a primeira classe envolvida na sinalização de receptores acoplados a proteína G, enquanto a segunda é presente na sinalização de receptores de opsoninas (CD32, CD16, CD11b) (Dusi et al., 1994; Helberg et al., 1996; Jiang et al., 1997; Wilde, Watson, 2001; Naccache, 2013).

A proteína kinase C (PKC) compreende-se a família relacionada as serinas/treoninas quinases, que se encontram no cruzamento de várias vias de sinalizações. A PKC em neutrófilos é ativada com agonistas associados aos receptores GPCR, CR3 e Fcγ (Dekker et al., 2000; Chakarbarti, Patel, 2008, Tan, 2012, Futosi et al., 2013).

A família das PKCs consiste em pelo menos dez membros divididos em três subfamílias, de acordo com seus domínios estruturais e sua regulação: (i) nas PKCs convencionais (cPKCs: PKCα; PKCβ; PKCγ); (ii) nas novas PKCs (nPKCs: PKCδ; PKCε; PKCθ, PKCη) e (iii) as atípicas PKCs (aPKCs: PKCζ; PKCι/λ) (Bertram, Ley, 2011; Naccache, 2013).

As proteínas kinases C estão localizadas no citosol nas células em repouso, visto que, na ausência de cálcio e DAG, essas enzimas possuem uma interação fraca e transitória interação com a membrana. Com a mobilização intracelular de cálcio, resultante da ação do mensageiro secundário IP_3 , faz com que este ligante solúvel (Ca^{2+}) se ligue no domínio C2 da PKC, induzindo o aumento na afinidade da enzima com a membrana, embora ainda relativamente baixa. Uma vez ancorada, a enzima se difunde no interior do plano da bicamada lipídica, onde encontrará o DAG que, por sua vez, irá interagir com domínio C1. Assim, a energia combinada pelo engajamento dos domínios C1/C2 leva um aumento da afinidade de ligação da PKC com a membrana, provocando uma mudança conformacional de modo a expulsar o domínio pseudosubstrato autoinibitório presente do sítio de ligação do substrato e, assim, promovendo a sua ativação completa. (Steinberg, 2008). Farmacologicamente, as PKCs também podem ser ativadas por ésteres de forbol, como o PMA, o qual, além de não ser rapidamente metabolizado, se liga a enzima numa ordem de magnitude de afinidade duas vezes maior que o DAG (Mosior, Newton, 1996)

As isoformas que os neutrófilos expressam são: $PKC\alpha$, $PKC\beta$ e $PKC\delta$ (Balasubramanian et al., 1998; Devalia et al., 1992), embora ainda permanece a discussão sobre a presença de outras isoformas ($PKC\theta$; ζ ; ι/λ) (Balasubramanian et al., 2002; Dang et al. 1994; Laudanna et al., 1998). Essas diferentes isoformas da enzima estão provavelmente envolvidas em várias funções de neutrófilos, como: o *burst* oxidativo (Nixon, MacPhail, 1999; Fontayne et al., 2002; El-Benna et al., 2009; Kilpatrick et al., 2010), apoptose (Geraldes, King, 2010) e a regulação nos eventos iniciais da sinalização, como a fosforilação de tirosinas após a estimulação de neutrófilos (Brumell et al., 1997). Essas enzimas em neutrófilos podem estar ainda envolvidas na adesão, desgranulação e fagocitose, mas ainda não está bem esclarecido esses efeitos da PKC (Bertram, Ley, 2011)

As fosfolipases D (PLD) são enzimas que catalisam a reação da fosfatidilcolina (FC) para geração de colina e ácido fosfatídico (AF). Este último produto, pode ser metabolizado a ácido liso-fosfatídico (pela PLA_2) ou diacilglicerol (pela fosfolipase) (Gomez-Cambroner, Keire, 1998). Um grande número de receptores tem sido descritos como ativadores da PLD, os quais incluem: receptores de fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou fator de crescimento epidérmico (EGF); receptores de recrutamento de tirosinas quinase, como GPCRs (receptores de quimiocinas e quimioatrantes, como FRP), FcR, CR, TCR e BCR (Gomez-Cambroner, Keire, 1998; Serrander, Fallman, Stendhal, 1996; Melendez, Allen, 2002).

A atividade da PLD e seus produtos (AF, DAG) tem sido associados na regulação de uma ampla resposta celular, incluindo diversas funções importantes de neutrófilos, inclusive o burst respiratório (Agwu et al., 1991; Bauldry et al., 1991; Zhou et al., 1992; Serrander et al., 1996; Corrotte et al., 2006; Carrigan et al., 2007; Chae et al., 2008).

As moléculas sinalização descritas anteriormente são apenas algumas entre as diversas outras envolvidas nas vias de sinalizações, que regulam as respostas funcionais de neutrófilos humanos, como observado em diversas revisões atuais da literatura científica (Bradshaw, 2010; Naccache et al., 2013; Futosi et al., 2013).

1.2.2. Fagocitose

A fagocitose é um processo descrito como o reconhecimento e a captação de partículas relativamente grandes ($>0.5\mu\text{M}$) no interior de vacúolos, sendo um fenômeno ativo mediado por receptores de fagócitos profissionais e, essencial na remodelação tecidual, inflamação e defesa contra agentes infecciosos (Tjelle, Løvdal, Berg, 2000, Amulic et al., 2012).

Nos neutrófilos, assim como nos macrófagos, a fagocitose ocorre inicialmente pelo reconhecimento de partículas não-opsonizadas e opsonizadas, sendo neste último caso, mediado por Fc γ R e CR. Durante a ativação desse processo pelos receptores Fc γ R e CR observa-se a reorganização e polimerização dos filamentos de actina, eventos essenciais para o englobamento das partículas (Groves et al., 2008). Contudo, o mecanismo de captação se difere entre os receptores.

Na fagocitose iniciada por Fc γ R, observa-se o modelo denominado de zíper, caracterizado pela propagação de pseudópodes de membrana ao redor da partícula ou do patógeno para a formação do fagossomo. Por sua vez, na fagocitose mediada por CR não se observa extensão de membrana (ou pseudópodes), sendo que as partículas ligadas aos CR se afundam diretamente no corpo da célula para que ocorra a internalização das mesmas. Este modelo de fagocitose é caracterizado como “sinking” ou afundamento (Underhill; Ozinsky, 2002).

Vale ressaltar que no estudo recente de Santos e colaboradores (2015), a cinética da fagocitose de ICs opsonizados por neutrófilos humanos, difere-se quando esse processo é mediado por Fc γ R e CR3, separadamente, ou por ambos receptores. No entanto, a atuação conjunta de tais receptores não induz aumento na eficácia da internalização dos ICs, se comparada a fagocitose desencadeada pelos receptores separadamente.

1.2.3. Desgranulação

Durante o desenvolvimento e sua maturação, os neutrófilos sintetizam uma infinidade de substâncias perigosas que, evolutivamente, são transportadas nessas células, ao longo da corrente sanguínea, em organelas de armazenamento denominadas grânulos, que serão liberados corretamente em momentos apropriados. No entanto, os grânulos são muito mais do que repositório de organelas latentes de conteúdo danoso, são elementos ativos e indispensáveis ao amplo espectro das atividades dos neutrófilos durante uma resposta inflamatória (Amulic et al., 2012).

Existem quatro tipos principais de grânulos presentes nos neutrófilos (**Figura 1.2**):

1) os azurofílicos (também denominados de primários) que são os maiores em diâmetro ($0.3\mu\text{M}$) e os primeiros a serem formados. A proteína 'biomarcadora' desta classe de grânulos é a enzima mieloperoxidase (MPO), contudo nessa organela também está incluso as defesinas, lisozima, a proteína de aumento de permeabilidade e bactericida (BPI), e algumas serinas proteases como: elastase de neutrófilos (NE) e catepsina G (CG). 2) os grânulos específicos (ou secundários) são aqueles de tamanho pouco menores ($0.1\mu\text{M}$), não contém a MPO e são formados posteriormente aos azurofílicos. Essa classe de grânulos é caracterizada pela lactoferrina, mas também detém glicoproteínas e uma amplitude de compostos antimicrobianos. 3) Já, os grânulos denominados de gelatinase (ou terciários) são menores ainda ao anterior, sendo a classe formada nos estágios finais da maturação dos neutrófilos e descritas com poucas substâncias antimicrobianas, servindo como estocagem para metaloproteases, como a gelatinase e leucolisina. 4) Por fim, existem as vesículas secretórias as quais, diferentemente das demais classes de grânulos, não surgem a partir do complexo de Golgi, mas são formados através de endocitose. Consequentemente, nessas vesículas predominam-se as proteínas plasmáticas (como a albumina) e moléculas de ligação a membrana (CD35, CD11b, FRP), resultando na apresentação de receptores de adesão e de quimiotáticos, essenciais na transmigração dos neutrófilos (Faurschou, Borregard, 2003, Borregaaard et al., 2007, Amulic et al. 2012, Mayadas et al., 2014).

Figura 1.2: Desenvolvimento dos neutrófilos e formação dos grânulos. Esquema elaborado a partir de adaptações de Amulic et al. (2012) e Bordoel et al. (2014).

Em geral, os grânulos se fundem com a membrana dos fagossomos formados durante a captura de patógenos. Contudo, durante a ativação dos neutrófilos, essa fusão dos grânulos também pode ocorrer com a membrana destas células, culminando na liberação extracelular dos conteúdos destes grânulos, comumente observado durante o processo de fagocitose frustrada. A ordem hierárquica na propensão da desgranulação dessas classes de grânulos é dependente da elevação das concentrações citosólicas de cálcio, sendo essencial a seguinte sequência: vesículas secretórias > terciários > secundários > primários (Sengeløv et al., 1993). Isto por que, após a exocitose das vesículas secretórias nota-se a mobilização dos grânulos terciários e secundários, os quais facilitaram a migração dos neutrófilos, mediante a remoção de barreiras físicas através da degradação do colágeno na membrana basal. Finalizada a transmigração celular e alcançando o sítio inflamatório, os grânulos primários e secundários serão as classes atuantes durante o processo fagocítico, de maneira que, os peptídeos antimicrobianos e componentes enzimáticos do *burst* respiratório atuem na fase da eliminação do patógeno (Mayadas et al., 2014).

Em suma, a importância do processo de desgranulação está envolvida na excitação das principais funções efetoras dos neutrófilos, visto que eleva o número de receptores de membrana, oferece ativação inicial das células, acentua o processo de fagocitose, aumenta a expressão dos componentes do complexo NADPH oxidase na membrana, que por consequência, ascende a produção das espécies reativas e assim, em conjunto, propicia na

eliminação de agentes infecciosos durante a atividade microbica (Pruchniak, Arazna, Demkow, 2013; Bardoel et al., 2014).

1.2.4. Metabolismo oxidativo: produção das espécies reativas de oxigênio (ERO)

Como mencionado, os neutrófilos são descritos como principais populações celulares na primeira linhagem de defesa contra os microrganismos. Em conjunto com o reconhecimento e a fagocitose de agentes patogênicos, observa-se um repentino aumento no consumo de oxigênio, denominado de *burst* respiratório ou metabolismo oxidativo (Dupré-Crochet, Erard, Nüße, 2013; Karimi et al., 2014). Esse processo compreende-se na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são gerados a partir da ativação de duas principais enzimas-chaves: NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO) (Amulic et al., 2012, Karimi et al., 2014, Mayadas et al., 2014).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático multi-proteico gerado durante a ativação de estímulos solúveis (PMA e fMLP) ou particulados, como os imunocomplexos (ICs) (Crockett-Torabi, Fatone, 1990; Nauseef et al. 1991; Decoursey, Ligeti, 2005).

A ativação dessa enzima envolve a montagem dos seus componentes proteicos primeiramente na membrana plasmática e, posteriormente, na membrana fagossômica. (Dahlgren, Karlsson, 1999). O complexo enzimático da NADPH oxidase é constituído em seis subunidades proteicas, duas localizadas na membrana denominadas como $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, as quais formaram o conjunto flavocitocromo b558 (o núcleo catalítico da enzima); e quatro citosólicas conhecidas como $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e Rac1/2, sendo essa última membro do grupo das pequenas GTPases da família Rho (Karimi et al., 2014).

Devido as propriedades nocivas das ERO, a produção das mesmas é finamente controlada, através de uma precisa regulação espacial e temporal (Quinn, Gauss, 2004; Groemping, Ritting, 2005; Sumimoto, 2008) Isto por que, na ausência de estímulos ou agentes patogênicos, os neutrófilos em estado de repouso apresentam a enzima NADPH oxidase na forma inativa, através da localização separada das suas subunidades citosólicas e de membrana, sendo as primeiras retidas no citosol e, as últimas mantidas nos grânulos específicos (terciários) e na membrana plasmática (Sengeløv, 1992). Por outro lado, durante ativação dos neutrófilos as proteínas citosólicas, predominantemente pré-montadas na forma de trímero ($p40^{phox}$ - $p47^{phox}$ - $p67^{phox}$), se translocam e interagem com as subunidades de membrana ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$). A quarta subunidade citosólicas desse complexo enzimático, a GTPases Rac-1 e 2, também são requeridas e translocadas para membrana durante ativação de

neutrófilos, principalmente na fagocitose mediada via $Fc\gamma R$ (Heyworth et al. 1991, 1994; Dusi et al., 1996; Wientjes et al., 1996; Fuchs et al., 1996; Kim, Dinauer, 2001; Lapouge et al., 2002; Sheppard et al., 2005).

A translocação dessas subunidades demonstra ser dependente da fosforilação das mesmas, mediante ação da PKC, da Akt, e das MAPK's (ERK e p38), envolvidas em diferentes vias de sinalização intracelular (El-Benna et al., 1996; Chen et al., 2003; Dang et al., 2011). Além disso, alterações estruturais geradas no processo de fosforilação permitem que os constituintes se posicionem e se liguem adequadamente durante a formação deste complexo (Sheppard et al., 2005).

Uma vez estabilizada a ativação da NADPH oxidase, esse complexo enzimático é capaz de promover transferência de elétrons para oxigênio molecular (O_2), oceptor final desses elétrons, havendo a conversão em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A produção de ânion superóxido por neutrófilos, e outros fagócitos, é um passo importante na resposta imune inata. Isto por que, o produto final da NADPH oxidase é o precursor da geração de uma gama de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), tais como o radical ânion o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o ácido hipocloroso (HOCl), cloraminas, óxido nítrico (NO), e peroxinitrito (OONO-) (Fang, 2004, Groemping, Ritting, 2005; Amulic, 2012).

O ânion superóxido produzido, por sua vez, poderá ser dismutado por ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente em pH ácido (Klebanoff, 1980; Bedard; Krause, 2007), gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cuja espécie reativa de oxigênio será o substrato alvo da próxima enzima-chave do *burst* respiratório: a mieloperoxidase (Fang, 2004; Amulic et al., 2012).

1.2.4.1. Mieloperoxidase (MPO): estrutura, ativação e seu envolvimento na produção de ERO de neutrófilos humanos

Em 1941, Agner – pesquisador pioneiro em obter uma preparação de MPO altamente purificada e, que inicialmente nomeou esta enzima como verdeperoxidase, como resultado da intensa coloração verde – demonstrou que a enzima está presente nos neutrófilos numa concentração cerca de 1-2% do peso seco total destas células. E de fato, o nível da MPO em neutrófilos está numa amplitude de 2-5% do total de proteínas celulares, sendo equivalente à 2-4 μg por 10^6 células. (Schultz, Kaminher, 1962; Bos, Wever, Roos, 1978, Klebanoff, 2005).

No desenvolvimento das células granulocíticas (mielopoiese) na medula óssea, a enzima mieloperoxidase (MPO) é ativamente sintetizada nos estágios de promielócitos e promonócitos, respectivas etapas na diferenciação de neutrófilos e monócitos. A síntese dessa enzima nos neutrófilos normalmente é cessada quando se inicia o estágio mielócito, de modo que, a MPO é contida nos grânulos primários (ou azurófilos) e distribuída para células-filhas, nas quais serão formados os novos grânulos: os secundários (específicos) que, por sua vez, não contém a peroxidase em questão. Em contrapartida, os grânulos contendo a MPO são formados nos promonócitos e facilmente evidentes nos monócitos maduros. Contudo, tais grânulos geralmente são perdidos ou reduzidos, quando essas células se diferenciam em macrófagos teciduais (Klebanoff, 2005; van der Venn, de Winther; Heeringa, 2009).

1.2.4.1.2. Propriedades estruturais e enzimáticas da MPO

A atividade enzimática da mieloperoxidase consiste em duas etapas: halogenação e peroxidação, gerando três diferentes estágios conformacionais da enzima denominados compostos I, II e III, estando intimamente relacionados com a formação dos produtos reativos do *burst* respiratório de fagócitos.

No estado basal, a enzima contém ferro na forma férrica (Fe^{3+}) ligado a estrutura de porfirina, formando o grupamento heme localizado no sítio ativo. A MPO utiliza o peróxido de hidrogênio para a oxidação de haletos (Cl^- , Br^- , I^-) ou de pseudohaletos (tiocianato; SCN^-), para geração de ácidos hipohalosos ou pseudohalosos, respectivamente. A oxidação dos haletos inicia-se, primeiramente, pela reação do H_2O_2 com a enzima na forma nativa (MPO- Fe^{3+}), cujo substrato reduzirá o íon para oxi-ferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$), gerando o intermediário instável denominado: composto I. Essa forma instável da MPO (composto I), por deter dois equivalentes oxidantes a mais do que a enzima na forma nativa, é capaz de oxidar diretamente os haletos, de modo a restaurar o estágio nativo da enzima e gerar os seus produtos: ácidos hipohalosos. Estas reações compreendem a via de halogenação (ou cloração - **Figura 1.3**) (Furtmüller, Burner, Obinger, 1998; Fiedler, Davey, Fenna, 2000).

Figura 1.3: Ciclos de cloração e peroxidação da mieloperoxidase e reações de formação dos compostos intermediários I e II. Adaptações de Soubhye et al., 2013

O mecanismo de formação do intermediário instável (composto I) parece ser dependente de dois resíduos de aminoácidos próximos ao grupo heme: His-95 e Arg-239. A função desta histidina distal compreende-se como um catalisador ácido-base na ocorrência da clivagem heterolítica do peróxido de hidrogênio, tendo a arginina a função secundária de auxiliar na estabilização do centro oxi-ferril, resultante na formação do composto I (Figura 1.4) (Poulos, Kraut, 1980).

Figura 1.4: Esquema do ciclo de cloração da mieloperoxidase (MPO) e formação do composto I. Arquitetura do grupo heme e os resíduos distais conservados His95 e Arg239, obtidos pela estrutura de raio-X (PDB ID:1CXP). (1) O substrato (peróxido de hidrogênio) se liga no grupo heme e doa elétrons, havendo a liberação da molécula de água. (2) A His95 promove a clivagem heterolítica do substrato, enquanto a Arg239 estabiliza a estrutura da enzima (3) A forma nativa da enzima (MPO-Fe³⁺) é oxidada pelo substrato gerando o composto I, que compreende-se na formação do oxi-ferril (Fe⁴⁺=O) e do cátion radical (•⁺) entre os anéis pirrólicos A e D constituintes da estrutura do grupo heme. Esquema baseado em Poulos, Kraut, 1980 e adaptações de Soubhye. et al (2010).

Durante o processo de restauração da forma nativa da enzima, uma parcela do composto I também pode ser convertido à composto II por causa da presença de doadores de elétrons (AH_2) exógenos ou endógenos. Esta reação inicia o ciclo de peroxidação da MPO (Hoogland et al., 1987; Furtmuller et al., 2006; Soubhye, et al. 2013). O composto II, resultante da primeira reação de redução pela doação de um elétron, é considerado uma forma intermediária inativa no âmbito do ciclo de cloração. Isto por que, esse composto II contém na sua estrutura o estado reduzido do átomo de ferro (oxi-ferril) no centro grupo heme, formando um complexo com uma hidroxila, havendo a perda do cátion radical entres os anéis pirrólicos que, por consequência, incapacita aquele composto intermediário de reagir com haletos (Hoogland et al., 1987; van der Venn, de Winther; Heeringa, 2009) (**Etapa 3 da figura 1.3, Etapa 4 da figura 1.5**)

Contudo, o ciclo de peroxidação da enzima MPO também abrange a segunda reação sequencial de redução por doação de elétron sobre o composto II, resultando na liberação de uma molécula de água e na restauração da forma nativa da enzima. (**Etapa 4 da figura 1.3, Etapa 5 da figura 1.5**). Vale ressaltar que, em altas concentrações de peróxido de hidrogênio, o composto I também pode reduzido em composto II antes da restauração da forma nativa da MPO, assim, neste caso, o H_2O_2 pode atuar como doador de elétron (Furtmuller et al., 2006; Malle et al., 2007).

Por fim, o intermediário composto III pode ser formado através da reação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com a forma nativa da enzima ($MPO-Fe^{3+}$) ou através da oxidação do composto II pelo H_2O_2 . O composto III, assim como o composto II, é considerado um intermediário inativo no âmbito do ciclo de cloração (ou halogenação) (**Figura 1.6**) (Hoogland et al., 1987; Paumann-Page et al., 2013).

Figura 1.5: Esquema do ciclo de peroxidação da mieloperoxidase (MPO) e formação do composto II e restauração da forma nativa da enzima. Arquitetura do grupo heme e os resíduos distais conservados His95 e Arg239, obtidos pela estrutura de raio-X (PDB ID:1CXP). (4) A primeira reação do ciclo de peroxidação inicia-se pela redução do composto I em composto II pela primeira doação de elétron. (5) A segunda reação do ciclo compreende-se na redução do composto II para forma nativa da enzima através da segunda sequencial doação de elétron. Esquema baseado em Poulos, Kraut, 1980 e adaptações de Soubhye. et al (2010).

Figura 1.6: A formação do composto I, II, e III nas etapas enzimáticas da MPO. Composto I é formado pela oxidação da MPO por H₂O₂ através do processo de dois elétrons. Na presença do doador de elétrons (HÁ), o composto I é reduzido para o composto II através do processo doação de um elétron (reação 3a e 3b). O Composto II pode ser reduzido por outro doador de elétron (AH) para restauração da forma nativa da enzima MPO (Reações 4a e 4b). Altas concentrações de H₂O₂ promove a conversão do Composto II em Composto III e o ciclismo da MPO que inclui o estado férrico e ferroso, o Composto I, Composto II e Composto III. Após a reação do composto III com um excesso de peróxido de hidrogénio, os reativos oxidantes formados podem reagir e destruir o grupo heme, bem como oxidar a proteína. Esquema adaptado de Paumann-Page et al., 2013.

1.2.4.1.3. MPO na modulação de respostas imunes inflamatórias

A produção excessiva dos produtos oxidativos derivados da MPO e outras peroxidases está sendo associada a danos nos tecidos em muitas doenças, especialmente aquelas caracterizadas por inflamação aguda ou crônica. Isto tem sido evidenciado, pelo fato da habilidade do ácido hipocloroso (HOCl) oxidar biomoléculas, gerando modificações estruturais, nas quais, por exemplo, proteínas modificadas pelo este produto da MPO são detectáveis em tecidos lesionados (Lau; Baldus, 2006; van der Venn, de Winther; Heeringa, 2009). Além de tudo, o HOCl também é capaz de reagir rapidamente com a taurina, um ácido aminosulfônico abundante no citoplasma de neutrófilos, resultando na formação de taurina-cloramida. A geração de clorâmidas tem sido relacionada como mecanismos de prorrogar atividade de peroxidases, que contribui para danos celulares (Schuller-Levis, Park, 2003).

Contudo, além dos efeitos tóxicos diretos sabe-se também que o HOCl é capaz de modular a função e atividade de várias células do sistema imune. Em neutrófilos, o ácido hipocloroso no meio extracelular é capaz de induzir a apoptose nessas células (Tsurubuchi et al., 2001), como também de ativar o fator nuclear NF- κ B e a fosforilação de tirosinas em linfócitos T e B, culminando no aumento da sinalização de cálcio e produção de TNF α (Schoonbroodt et al., 1997; Schieven et al., 2002).

Alguns estudos também tem descrito a habilidade da MPO em exercer efeitos independentemente da sua atividade enzimática. Lefkowitz e colaboradores (1992) demonstraram que a administração intravenosa de MPO, em ratos, elevou os níveis circulantes de TNF- α e IFN- γ nesses animais. Em 1999, o mesmo autor e colaboradores, descreveram, *in vitro*, a exposição de macrófagos com MPO resultou na ativação dessas células, com a liberação de TNF- α e baixos níveis de IFN- γ , com consequente elevação da citotoxicidade dependente de macrófagos. Esse mesmo efeito ativador também foi observado em modelo de artrite, no qual a injeção intra-articular de fragmentos de parede celular de *Streptococcus*, juntamente com a injeção local de MPO ativa e parcialmente inativa, promoveu a elevação dos sinais clínicos da doença. Isto demonstra o papel dessa enzima na perpetuação da doença inflamatória crônica, e que a interação da MPO com os macrófagos é mediada por receptores de manose (Gelderman et al., 1998; Lefkowitz et al., 1999). Lau et al. (2005) observaram que a MPO é capaz de interagir com CD11b/CD18 em neutrófilos, promovendo ativação dessas células mediante aumento da fosforilação da p38 MAPK e da translocação do fator nuclear NF- κ B. Essa mesma interação MPO-CD11b/CD18 também

induz, *in vitro*, um retardo no processo de apoptose em neutrófilos, demonstrando que a indução de sinais de sobrevivência dessas células influenciou na duração da resposta inflamatória no modelo de lesão pulmonar (El Kebir et al., 2008).

De modo geral, a MPO já é bem descrita na literatura quanto ao seu papel fisiológico por contribuir substancialmente na atividade microbicida mediada por células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos), através da geração de reativos oxidantes, em particular, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Contudo, diversos trabalhos têm evidenciado em modelos experimentais o papel patogênico dessa enzima em várias doenças, tais como: cardíacas, neurodegenerativas, renais, pulmonares e cancerígenas. A relação da MPO com cada uma dessas doenças é bem descrita em revisões literárias (Klebanoff, 2005; van der Venn, de Winther; Heeringa, 2009).

1.3. A espécie *Baccharis dracunculifolia* De Candolle

Baccharis é considerado o maior gênero da família Compositae, com mais de 500 espécies distribuídas nos continentes Norte e Sul-americanos. As espécies deste gênero estão presentes principalmente nas regiões temperadas e tropicais do Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (Abad, Bermejo, 2007).

A espécie nativa do Brasil, *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), é popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha. Os registros dessa planta são descritos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, principalmente nas áreas de cerrado, em pastagens abandonadas e áreas de processo de sucessão (Park et al., 2004).

Caracterizada como uma espécie perene, dioica, de arbusto lenhoso (de até 4 metros de altura), com galhos bastante ramificados e folhas densamente pontuadas por tricomas tectores e glandulares, os quais atuam como barreira contra o ataque de predadores e auxiliam na interação dessa espécie com insetos, em especial as abelhas *Apis mellifera*, para a coleta do material resinoso utilizado para elaboração da própolis (Spring, 2000; Teixeira et al., 2005). Desse modo, a *Baccharis dracunculifolia* é descrita como a principal fonte botânica da própolis, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Bastos, 2001; Sawaya et al., 2004), contudo, uma outra pesquisa realizada no *campus* da UNESP de Botucatu observou que a *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora* são outras espécies vegetais, que também são fontes secundárias na produção da própolis (Bankova et al., 1999, Sforcin et al., 2012).

Da mesma maneira que a própolis brasileira tem sido até hoje alvo de estudos das suas propriedades biológicas e farmacológicas (Sforcin, 2007; Sforcin, Bankova, 2011; Bankova, Popova, Trusheva, 2014), os extratos e/ou óleos essenciais da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* também tem sido uma fonte de pesquisa num amplo espectro. Uma provável explicação para este fato deve-se que, ambas as substâncias apresentam uma grande semelhança nos perfis químicos, compartilhando alguns compostos em comum como: ácido cafeico, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter (AME), artemillin C, baccharina, entre outros (De Souza, et al., 2009).

Os efeitos biológicos já descritos com óleos essenciais ou extratos da *Baccharis dracunculifolia* são: atividade antioxidante (Ferronato et al., 2006; Guimarães et al., 2012; Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Rezende et al., 2014), anti-inflamatório (Dos Santos et al., 2010; Cestari, Bastos, Di Stasi, 2011), analgésico e inibidor da enzima COX-2 (Dos Santos et al., 2010), imunomoduladora (Missima et al., 2007; Bachiega et al., 2012), atividade antitumoral sobre linhagens de células leucêmicas (Fukuda et al., 2006) e de carcinoma de laringe humana (Búfalo et al., 2010); anti-viral (Búfalo et al., 2009), anti-úlceras (Lemos et al., 2007; Massignani et al., 2009), atividade microbicida (Da Silva Filho et al., 2008), atividade antiparasitária (Da Silva Filho et al., 2004, 2009, Parreira et al., 2010) e atividade cariogênica (*S. mutans*) (Leitão et al., 2004).

1.4. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos ocorrem universalmente no reino das plantas e são parte de um amplo e complexo grupo de substâncias orgânicas. As plantas são capazes de sintetizar e acumular uma ampla variedade de composto fenólicos, conferindo uma proteção contra o ataque de radicais livres, advindos de subprodutos do processo da fotossíntese e contra danos teciduais (Soares, 2002).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser classificados em dois grupos: flavonóides e os não flavonoides (ou fenólicos simples), sendo ambos considerados metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (**Figura 1.7**).

Figura 1.7: Classificação química dos compostos fenólicos. Esquema elaborado por Magnani et al., 2014.

Os denominados de flavonoides, também conhecidos como polifenóis, são os que apresentam a estrutura química descrita como $C_6-C_3-C_6$, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Já os denominados de não flavonoides (ou fenólicos simples) são classificados em três grupos (Burns et al., 2001; Melo, Guerra, 2002; Soares 2002):

(i) os derivados de ácidos hidroxibenzóico que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e, são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O ácido gálico é um representante dos ácido hidroxibenzóico.

(ii) os derivados de ácidos hidroxicinâmicos que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. Alguns exemplos são: ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, sinápico.

(iii) As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico.

1.4.1. Ácido cafeico

Ácido cafeico (**Figura 1.8**), ou 3,4-dihidroxicinâmico, é um composto orgânico fenólico pertencente a classe de ácidos hidroxicinâmicos presentes diversas fontes de alimentos, como: frutas (ameixa, maçã, pêra, kiwi, toranja, cidra, tomate, berinjela), bebidas alcoólicas (vinhos) e não alcoólicas (café e suco de frutas), óleos vegetais, sementes (nozes, de girassol), temperos (ervas, orégano, hortelã), legumes (couve-flor, chicória), vegetais de raiz (cenouras) e tubérculos (batata) (Manach et al., 2004; Phenol-Explorer: Database on polyphenol content in foods).

O ácido cafeico também já isolado a partir de inúmeras espécies de plantas pertencentes às famílias *Caprifoliaceae*, *Compositae*, *Cruciferae*, *Cucurbitáceas*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Polygonaceae*, *Saxifragaceae*, *Solanaceae*, *Theaceae*, *Umbelliferae*, e *Valerianaceae* (Hermann, 1956; Dhungyal et al., 2014). Além disso, este composto também é encontrado como um dos constituintes da própolis brasileira (Sforcin, 2007) e como um metabólito presente nas espécies do gênero *Baccharis* sp. (Park et al., 2004; De Sousa et al., 2009; Figueiredo-Rinhel et al., 2013).

Figura 1.8: Estrutura química do ácido cafeico.

Alguns dos efeitos biológicos já descritos para ácido cafeico são: atividade *scavenger*/antioxidante (Chen, Ho, 1997; Terao et al., 1973; Foley et al., 1999; Sroka, Cisowski, 2003; Karamac et al., 2005; Gülçin, 2006; Khanduja et al., 2006; Wu et al., 2007; Nakajima et al., 2009); atividade antimicrobiana (Almajano et al., 2007); ações antidiabética (Dhungyal et al., 2014); anticancerígeno (Chung et al., 2004; Chang et al., 2010; Rajendra et al., 2011, Yang et al., 2014); inibidor da peroxidação lipídica/atividade protetiva de danos teciduais (Laranjinha et al., 1996; Kang et al., 2006; Karthikesa, Pari, 2007); efeito antinociceptivo (Mehrotra et al., 2011), anti-neurodegenerativo (Tsai, Chao, Yin, 2011); inibidor de reações de nitrosação/agente antinitrosante (Pannala et al., 1998; De Lucia et al., 2006); inibidor da enzima 5-lipoxigenase (Koshihara et al., 1984; Mirzoeva, Calder, 1996)

Em células imunes, o ácido cafeico: (i) promoveu um efeito anti-apoptótico, independente de proteínas anti-apoptóticas, sobre as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Este efeito ocorreu mediante a inibição da peroxidação lipídica e de ação protetiva do DNA dessas células que foram exposta à um stress oxidativo por peróxido de hidrogênio (Khanduja et al., 2006). Outro estudo também demonstrou esta ação, no qual o pré-tratamento de linfócitos humanos com o ácido cafeico protege essas células contra o efeito citotóxico induzido pela exposição da radiação UV (Prasad, Jeyanthimala, Ramachandran, 2009), (ii) exerceu efeitos imunomodulatórios em monócitos humanos tais

como: redução da expressão de TLR-2 e HLA-DR, inibição da produção de TNF- α e aumento da atividade fungicida (Búfalo, Sforcin, 2015), (iii) atenuou respostas inflamatórias mediada por TLR-4, como a produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandinas E₂ (PGE₂), em linhagens de macrófagos (RAW 246.7) tratados com LPS (Yang et al., 2013); (iv) reduziu a produção de NO sobre a mesma linhagem de macrófagos, sendo que este efeito anti-inflamatório de ambas substâncias é mediado pela regulação da via do NF- κ B, visto que ambos inibiu a atividade deste fator de transcrição mediante redução da fosforilação do inibidor de NF- κ B (I κ B), além de também inibirem a fosforilação do p38MAPK e JNK1/2, moléculas de sinalização antecessoras a ativação do NF- κ B. (Búfalo et al., 2013), (v) foi o constituinte do extrato aquoso de *Tournefortia sarmentosa*, que induziu o aumento da função fagocítica de neutrófilos humanos e de células HL-60 diferenciadas, mediante o aumento da expressão de Mac-1 (CD11b/CD18) (Chen et al., 2014); (vi) demonstrou ser o principal metabólito secundário do extrato da *Baccharis dracunculifolia* (BdE) responsável pelo efeito modulatório do extrato sobre as ERO produzidas pelos neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado (Figuereido-Rinhel, 2013).

O conjunto destas observações destacam o papel imunomodulador do ácido cafeico em diversos processos celulares ressaltando a importância do entendimento dos mecanismos envolvidos nesta ação, em especial à mencionada no item “vi”.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi dar continuidade ao estudo do papel imunomodulador do ácido cafeico e do extrato etanólico bruto da *Baccharis dracunculifolia* sobre os neutrófilos humanos, de maneira a expandir o entendimento do potencial antioxidante de tais amostras naturais, bem como desvendar os mecanismos de suas ações sobre as funções efectoras das células, visando o desenvolvimento de novos fármacos candidatos à aplicação conjunta com os tratamentos empregados em doenças inflamatórias mediadas por neutrófilos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- ✓ Em um sistema livre de células, examinar os níveis de ação antioxidante das amostras (EEBBd e ácido cafeico), avaliando:
 - a habilidade *scavenger* do radical livre do DPPH; H₂O₂ e HOCl;
 - o potencial inibitório da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO);
 - as interações com a enzima MPO em análises computacionais.
- ✓ Em neutrófilos de indivíduos saudáveis, avaliar o efeito das amostras (EEBBd e ácido cafeico):
 - na viabilidade celular;
 - no metabolismo oxidativo das células estimuladas por estímulo independente (PMA) e dependentes de receptores FcγR e/ou CR3 (IC e IC-SHN);
 - na expressão de receptores Fcγ (CD16, CD32), CR3 (CD11b/CD18) e do tipo *toll* (TLR-2, TLR-4);
 - na capacidade fagocítica;
 - na habilidade microbicida.

3. CASUÍTICA E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Neste trabalho, foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico, adquiridos de fontes comerciais. As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada de um sistema Milli-Q (Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm ou autoclavagem a 120 °C por 20 minutos.

O ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *t*-cinâmico com aproximadamente 98% de pureza, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América).

Os reagentes Azul de Tripan, citocalasina D, isotiocianato de fluoresceína (FITC), luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona), N,N-dimetilformamida (DMF), ovalbumina (OVA), zimosan (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*), radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), taurina, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América). Os reagentes hidrazida do ácido 4-aminobenzoico (ABAH), H₂O₂, mieloperoxidase de leucócitos humanos (MPO, EC 1.7.1.11), foram obtidos da Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os demais reagentes foram adquiridos de fornecedores diversos: água sanitária doméstica Candura® (Iplasa, Piracicaba, SP, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt-Baker, Paris, KY, Estados Unidos da América), etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), gelatina Difco® de grau microbiológico (BD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos da América), kit para medida da atividade da LDH “LDH Liquiform” (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil), kit para coloração hematológica “Panótico Rápido LB” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil).

Os anticorpos IgG1-PE humano anti-FcγR/CD16 (clone 3G8), IgG1-PE camundongo isotipo para anti-CD16 (clone MOCPC-21; IgG1, kappa), IgG2b-FITC humano anti-FcγRII/CD32 (clone FLI 8.26), IgG2b-FITC camundongo isotipo controle para anti-CD32 (clone 27-35; IgG2b kappa) e anti-CD11b/CD18 (clone ICRF44) foram adquiridos da BD Pharmingen (San Diego, CA, Estados Unidos da América). Os anticorpos IgG2-FITC humano anti-TLR2/CD282 (clone TL2.1), IgG2a-FITC camundongo isotipo para anti-TLR2 (clone MOPC-173; IgG2a, kappa), IgG2a-PE humano anti-TLR4/CD284 (clone HTA 125) e IgG2a-PE camundongo isotipo para anti-TLR4 (clone MOPC-173; IgG2a, kappa) foram adquiridos da BioLegend (San Diego, CA, Estados Unidos da América).

3.2. Indivíduos saudáveis (Aspectos éticos)

Foram recrutados voluntários para a pesquisa nas dependências da FCFRP-USP pelos pesquisadores responsáveis. Eles eram saudáveis, não fumantes, com faixa etária entre 18 e 40 anos de idade, de ambos os sexos e não estavam fazendo uso de medicamentos. Os voluntários foram conscientizados sobre os objetivos do trabalho e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A realização desse procedimento seguiu as recomendações da resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP (CEP/FCFRP nº 331 – Anexo 1). Foi colhido cerca de 20 mL de sangue por punção venosa na região da fossa cubital por técnico capacitado, utilizando material estéril e descartável, isto é, devidamente limpo e livre de contaminação.

3.3. Isolamento de Neutrófilos

Os neutrófilos foram purificados pelo método da gelatina, descrito por Lucisano e Mantovani (1984) e com algumas modificações de Kabeya (2002). O sangue coletado através de punção venosa com sistema a vácuo foi diluído (v/v) em solução de Alséver pH 6.1, utilizada como anticoagulante, e posteriormente centrifugado (Eppendorf 5810 R, Hamburg, Alemanha) a $755 \times g$ por 10 minutos a 22°C. Após a remoção do plasma e da camada de células mononucleares, o sedimento foi diluído em solução de gelatina a 2,5%, preparada em NaCl 0,15 mol/L, e incubado em banho-maria a 37°C por 15 minutos. O sobrenadante rico em neutrófilos foi diluído em igual volume de NaCl 0,15 mol/L e centrifugado a $440 \times g$ por 10 minutos a 22°C. Para lisar os eritrócitos remanescentes, o sedimento foi suspenso em solução de NH_4Cl 0,83% pH 7.2, incubado por 5 minutos a 37°C, e então centrifugado a $480 \times g$ por 10 minutos a 22°C. O sedimento foi lavado com NaCl 0,15 mol/L e suspenso em 1 mL de solução Hanks contendo 0,1% de gelatina (Paula et al., 2009).

A suspensão de neutrófilos foi diluída de acordo com a necessidade de cada ensaio, e mantida em banho de gelo até o momento do uso. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de exclusão do corante azul de Tripan. As preparações de neutrófilos obtidas por este procedimento de purificação apresentaram cerca de 90% de pureza e 95% de viabilidade.

3.4. Preparação do Extrato Etanólico Bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd)

Foram utilizadas partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* coletadas no mês de Maio 2007. O material vegetal, cujas mudas foram providas do CPQBA-UNICAMP (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas), foi coletado em uma área de cerrado da cidade de Cajuru – SP. Após a coleta, o material foi seco e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40°C, por 48 horas. A amostra referente ao mês supracitado foi submetida ao processo de pulverização com uniformização do tamanho de partículas, através da utilização de um moinho de facas. Posteriormente, uma pequena porção do material seco e pulverizado foi utilizada para o preparo do extrato etanólico bruto de *B. dracunculifolia* (EEBBd) e o restante foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram vedados, identificados e armazenados em freezer a -20°C.

Foram utilizados 5 g do material vegetal seco e pulverizado referente mês de Maio de 2007, o qual foi transferido em um frasco tipo Erlenmeyer, com posterior adição de 100 mL de solução hidroalcoólica na proporção de 9:1. A amostra foi mantida em agitador mecânico do tipo “shaker” a 27°C, por 2 horas a 145 rpm. Após este período, o material foi filtrado em papel de filtro e, para uma melhor eficiência de extração das substâncias presente na amostra. O material vegetal retido no filtro (torta) foi submetido a uma nova extração nas mesmas condições anteriores (100 mL do solvente hidroalcoólico, agitação a 27°C por 2 horas a 145 rpm, filtragem em papel de filtro).

Os filtrados referentes às duas extrações foram reunidos e concentrado em evaporador rotativo (banho a 55°C), submetido a ultrassom (para recuperação de todo sólido aderido na parede da vidraria), transferido para um pequeno frasco previamente pesado e identificado, e colocado em uma estufa de ar circulante a 50°C durante 5 dias para secagem do extrato. (Figueiredo, 2010)

Após completa secagem o extrato denominado de Extrato Bruto Etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) foi utilizado para a realização dos ensaios biológicos. Esse extrato foi mantido em frascos tampados e sob refrigeração (4°C). (Figueiredo, 2010)

O extrato referente ao mês de Maio de 2007 foi utilizado neste trabalho por apresentar maior atividade oxidante, conforme os estudos previamente realizados por Figueiredo (2010).

3.5. Obtenção do soro humano normal (SHN)

Os soros foram obtidos a partir do sangue total de voluntários saudáveis, colhido por punção venosa, utilizando-se tubos tipo *vacutainer* sem anti-coagulante. O sangue foi deixado em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora, para retração do coágulo formado, sendo posteriormente centrifugado a $480 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O soro obtido foi reunido em um “pool”, fracionado e estocado a -70°C .

3.6. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos

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

Para a obtenção dos anticorpos foram utilizados coelhos da espécie Nova Zelândia, fêmeas, jovens de aproximadamente 3 kg, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os procedimentos experimentais realizados nesses animais seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa n° 05.1.1050.53.9, anexo 2).

Os coelhos foram imunizados com solução de antígeno (albumina de ovo de galinha – OVA, Sigma, St. Louis, Estados Unidos da América) preparada a 5 mg/mL em NaCl a 0,15 mol/L, e emulsionada em adjuvante completo de Freud (1:2). A emulsão foi administrada por via subcutânea no dorso do animal, sendo que cada animal recebeu quatro injeções de 0,5 mL, totalizando 5 mg de OVA por animal. Após 30 dias, os mesmos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e ketamina (35 mg/kg) para colheita do sangue por punção cardíaca, sendo os animais eutanasiados em câmara de CO_2 imediatamente após o término do procedimento.

O sangue ficou em repouso por 1 hora em temperatura ambiente (25°C) para retração e desprendimento do coágulo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado ($755 \times g$, 15 minutos, 4°C). O soro obtido foi mantido em banho-maria (30 minutos, 56°C), para inativação dos componentes do sistema complemento e, logo após, armazenado em freezer a -20°C .

3.6.2. Purificação de IgG anti-OVA a partir do soro imune

Para purificação das imunoglobulinas foi utilizada a metodologia descrita por Fahey et al. (1964), modificada por Lucisano e Mantovani (1984). As imunoglobulinas presentes no soro foram precipitadas pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado, em quantidade suficiente para atingir 40% de saturação. A mistura ficou em repouso por 12 horas a 4°C, e depois foi centrifugada ($1800 \times g$, 15 minutos, 25°C). O precipitado foi lavado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% (m/v), centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores, dissolvido em PBS pH 7.4 e dialisado contra solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7.4) a 4°C por 24 h.

Após essa etapa, empregou-se a técnica de cromatografia de troca iônica para purificar a IgG contida na amostra dialisada. Para isso, foi utilizada a resina dietilaminoetil (DEAE)-celulose como fase estacionária e solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7.4) como fase móvel. O efluente da coluna foi recolhido e as proteínas foram detectadas por meio da leitura da absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão). Após a eluição do pico I, que contém a IgG total, adicionou-se solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7.4) suplementada com 1 mol/L de NaCl para eluir as demais proteínas presentes na amostra (Figura 3.1). As frações correspondentes ao primeiro grupo de proteínas eluídas foram reunidas e concentradas por ultrafiltração (sistema Amicon) em membrana de celulose com limite de exclusão de 100 kDa. Por último, as amostras foram fracionadas em tubos tipo *ependorf* e armazenadas a -20°C até o uso.

Figura 3.1: Perfil cromatográfico de soro imune rico em IgG anti-OVA. Purificação realizada em coluna de DEAE-celulose. Utilizou-se como fase móvel solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) para eluição do grupo 1 (IgG total), e tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) acrescido de 1 mol/L de NaCl para eluição do grupo 2 (demais proteínas séricas contidas na amostra). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, e o volume de cada fração cromatográfica foi de 5 mL, coletada em temperatura ambiente. Abreviaturas: DEAE: dietilaminoetil; IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovalbumina.

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

As amostras de IgG purificadas foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo-se o método descrito por Laemmli (1970). Alíquotas da preparação de IgG e os padrões de proteínas de alta e média massa molecular foram diluídas em uma solução contendo tampão Tris 0,06 mol/L pH 6,8, 4% de SDS, 20% de glicerol, e azul de bromofenol, e incubadas a 37 °C por 30 minutos. A eletroforese foi desenvolvida sob corrente contínua de 10 mA, utilizando-se tampão Tris-glicina pH 8,3 como fase móvel, até a completa migração do corante azul de bromofenol.

O gel foi corado por 30 minutos com Coomassie Brilliant Blue “G”, preparado a 0,25% (m/v) em metanol a 50% (m/v) e ácido acético a 7% (v/v), e depois lavado por diversas vezes com solução descolorante composta de metanol a 5% (v/v) e ácido acético a 7% (v/v).

Figura 3.2: Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA. (1) 10µg de IgG (2) 5µg de IgG. Os valores de massa molecular das soluções padrões indicados na figura. Abreviatura: IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina

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

No intuito de avaliar a habilidade da IgG em reagir com o antígeno, bem como as quantidades relativas de IgG e OVA necessárias para formação de imunocomplexo, foi construída a curva de precipitação para determinação quantitativa do ponto de equivalência. Para isso, alíquotas do anticorpo foram diluídas 1:2 em PBS e a solução do antígeno (OVA, 1

mg/mL) foi diluída em PBS nas seguintes proporções: s/d, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Em seguida, volumes iguais de antígeno e anticorpo foram misturados, e a reação foi incubada (1 hora, 37°C) e depois mantida em refrigeração (12 horas, 4°C) para formação dos IC.

As suspensões formadas foram centrifugadas (7200g, 15 minutos, 25°C), lavadas por duas vezes e suspensas em NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, o precipitado formado foi dissolvida em NaOH 0,1 mol/L e diluída em NaCl 0,15 mol/L, para leitura de absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm. O ponto de equivalência obtido foi: antígeno diluído 1:4, e anticorpo diluído 1:2 (Figura 3.3).

Figura 3.3: Determinação do ponto de equivalência da reação entre OVA em diferentes diluições e IgG anti-OVA (diluída 1:2). A análise foi feita por meio da determinação da concentração de proteínas pela medida de absorvância em 280 nm. Abreviaturas: IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovoalbumina.

3.7. Preparo dos estímulos:

3.7.1. Preparo de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)

O PMA foram dissolvidos em DMSO, na concentração de 10^{-2} mol/L, e estocados a -70 °C. No momento do uso, alíquotas desses estímulos foram diluídas em solução de Hanks pH 7.2, para concentração final de 10^{-7} mol/L.

3.7.2. Opsonização do Zimosan (ZIops)

Zimosan (ZI) (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*) é uma preparação insolúvel em meio aquoso, formada de resíduos polissacarídeos da parede celular de levedura que, em contato com o soro, ativa o sistema complemento, produzindo partículas revestidas (opsonizadas). Nesta forma, estas partículas são reconhecidas por receptores presentes na membrana dos neutrófilos, facilitando o processo de fagocitose (Woeber, Ingbar, 1973).

Uma suspensão de ZI (20 mg/mL) em solução fisiológica foi mantida em banho fervente por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a $453 \times g$ por 5 minutos. Para cada 1mg de ZI adicionou-se 0,1 mL de soro humano diluído 1:2 em CFD (Tampão Diluente para Fixação de Complemento). Após incubação a 37°C por 30 minutos obteve-se o zimosan opsonizado (ZIops). A suspensão foi centrifugada a $805 \times g$ por 5 minutos e o sedimento formado foi lavado por duas vezes com PBS e centrifugado nas mesmas condições. A concentração da suspensão de ZIops foi ajustada, de acordo com o requerido para cada experimento, com solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina.

3.7.3. Marcação do Zimosan com FITC (ZI-FITC)

Uma suspensão de Zimosan (20 mg) em solução de tampão fosfato-salino (PBS) foi mantida em banho fervente por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a $1258 \times g$ por 10 minutos. O sedimento foi suspenso com isotiocianato de fluoresceína (FITC, 25 µg/mL) em tampão de carbonato (70 mL de NaHCO_3 0,1M; 30 mL de Na_2CO_3 0,1M; pH 9.5), mantendo esta solução em incubação a 37°C por 30 minutos sob agitação. Após a incubação, a suspensão foi lavada por duas vezes com tampão carbonato e outras duas vezes com tampão Hanks sob centrifugação a $1258 \times g$ por 10 minutos. Por fim, o sedimento de ZI-FITC foi suspenso com tampão Hanks ajustando numa concentração de 20mg/mL. A suspensão de ZI-FITC foi aliquoteada e estocada a -20°C.

3.7.4. Preparação dos imunocomplexos (ICs)

Os imunocomplexos foram preparados adicionando-se o antígeno (OVA) sobre o anticorpo IgG, nas proporções estabelecidas pelo ponto de equivalência (anticorpo 1:2 e antígeno 1:4). A mistura antígeno-anticorpo foi incubada (37°C, 1h) e posteriormente a 4°C por 24h. O precipitado foi centrifugado ($12000 \times g$, 15 minutos, 4°C), lavado 2 vezes com PBS e finalmente suspenso em 1,1 mL de PBS.

Uma alíquota de 100 µL da suspensão foi misturada com igual volume de NaOH 0,1 mol/L e o volume completado para 1 mL com PBS, para quantificação de proteínas através da leitura de absorvância em 280 nm.

3.7.5. Opsonização dos imunocomplexos (ICs)

Os imunocomplexos foram centrifugados ($12000 \times g$, 15 minutos, 4°C). Em cada sedimento de IC formado foi adicionado soro humano normal (SHN) diluído 1:2 em tampão para fixação de complemento (CDF) (Weir, 1986) suplementado com 0,1% de gelatina, na proporção de 1 μL de soro para cada 1 μg de IC. Após incubação (30 minutos, 37°C), as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições e suspensas em PBS na concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.8. ENSAIOS EM SISTEMAS NÃO-CELULARES

3.8.1. Avaliação da atividade antioxidante de algumas substâncias presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia* frente ao radical DPPH $^{\bullet}$

A atividade antioxidante dos compostos derivados do ácido cinâmico presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia* (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico) frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $^{\bullet}$) foram avaliados seguindo-se o método descrito por Blois (1958) e modificado por Rodrigues e colaboradores (2002).

Este radical possui cor violeta em solução (detectável a 515 nm) e, ao ser reduzido pelas substâncias antioxidantes, a solução sofre descoloração. Assim, quanto maior o potencial antioxidante de um composto, mais rápida e acentuada será essa descoloração. Desta forma, este método é baseado na captura do radical DPPH $^{\bullet}$ por agentes antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (Figura 3.4).

Figura 3.4: Estrutura do DPPH $^{\bullet}$ antes e após a reação com compostos antioxidantes (AH).

A solução de DPPH[•] (0,5 mmol/L), preparada em etanol, foi misturada com solução tampão acetato de sódio (0,1 mmol/L; pH 5.5) na proporção de 3:7 e foi medida a absorvância inicial em 510 nm (espectrofotômetro DU-70, Beckman, USA). Em seguida, foram adicionadas alíquotas (5 µL) os compostos derivados do ácido cinâmico (2 mmol/L) em 1 mL da solução (DPPH/etanol + tampão acetato de sódio/etanol). Após incubação por 5 minutos, no escuro, a absorvância final destas soluções foram medidas em 510 nm, para análise do consumo do DPPH[•]. Como controle positivo do experimento, avaliou-se a atividade antioxidante da quercetina a (20 µmol/L), uma vez que este flavonóide possui uma elevada e conhecida atividade antioxidante (Kabeya, 2002).

Sob as mesmas condições, foram realizados testes com diferentes concentrações o ácido cafeico 1 - 80 µmol/L ($\approx$ 0,18 - 14,40 µg/mL), afim de obter o valor de CI_{50}^{DPPH} . A atividade de redução do DPPH foi avaliada em duplicata. A porcentagem de DPPH reduzido foi calculada segundo a equação:

$$\text{DPPH reduzido (\%)} = \frac{\text{Absorvância inicial} - \text{Absorvância final}}{\text{Absorvância inicial}} \times 100$$

A partir dos valores de inibição foi calculado o valor da concentração da substância que inibe 50% da redução do DPPH (CI_{50}^{DPPH}).

3.8.2. Análise do efeito *scavenger* de HOCl

3.8.2.1. Quantificação de HOCl na água sanitária doméstica

Para verificar se o ácido cafeico possui a atividade “scavenger” sobre HOCl, a substância fenólica foi incubada juntamente com concentração conhecida de HOCl (presente em água sanitária comercial) com posterior verificação da alteração da concentração desse composto presentes no meio (através do método de oxidação do TMB - tetrametilbenzidina).

A quantificação do HOCl na água sanitária comercial (ASC) foi realizada através de ensaio espectrofotométrico a 292 nm. Para isso, a ASC foi primeiramente diluída em água deionizada (1:25) e posteriormente diluída em solução de KOH 8 mol/L (1:5). A absorvância foi lida em 292 nm e a concentração do hipoclorito foi calculada considerando-se o coeficiente de extinção (ϵ) igual a 350 M⁻¹cm⁻¹. (Dypbukt et al., 2005).

Depois de calculada a concentração de hipoclorito na ASC, foi confeccionada uma curva padrão de hipoclorito para a determinação da melhor concentração a ser utilizada nos ensaios. Para isso, a ASC foi diluída para 0,5 mmol/L em tampão PBS pH 7.4 e diferentes volumes de ASC foram incubados em placa de 96 poços, juntamente com PBS contendo taurina (5 mmol/L), de forma que o volume final fosse de 200 μ L e as concentrações de HOCl no meio fossem de 0 à 70 μ mol/L. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se o revelador, composto de: 2 mmol/L de TMB, 10% de dimetilformamida (DMF), e 0,1 mol/L de iodeto de potássio (KI), em tampão acetato 0,4 mol/L pH 5,4. A mistura reacional foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, a absorvância do produto foi lida em 630 nm, utilizando-se leitor de microplacas (EIA multiwell reader, Sigma Diagnostics, Estados Unidos da América). O valor de absorvância do branco, contendo todos os reagentes exceto o HOCl, foi subtraído da absorvância das amostras. A concentração de HOCl de 50 μ mol/L foi a selecionada para ser utilizada nos ensaios de avaliação da atividade “scavenger” do HOCl, onde o valor de absorvância foi adequado à sensibilidade de medida do equipamento.

Figura 3.5: Curva padrão de HOCl. Detecção do oxidante através da oxidação da TMB na presença de dimetilformamida e KI, em tampão acetato 0,4 mol/L pH 5,4. Valores de absorvância obtidos a 630 nm referente à oxidação do TMB pela taurina-Cl formada pela interação do HOCl e da taurina. Curva referente a um experimento e representativos de outros três experimentos independentes com medidas em triplicata

3.8.2.2. Avaliação do efeito *scavenger* de HOCl pelo ácido cafeico

O ácido cafeico (0,018 – 3,6 µg/ml) ou o solvente (dimetilformamida; 0,06%) ou tampão fosfato (branco - PBS) foram incubados com HOCl (0.05 mmol/L por 10 minutos). Em seguida, foi adicionada taurina (5 mmol/L) e, após 5 minutos, foi adicionado o revelador. Após 5 minutos de reação, a absorvância final foi medida em 630 nm em leitor de microplacas de 96 poços (EIA Multi-well Reader II, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, Estados Unidos da América).

Com os valores de absorvância (630 nm) referentes à oxidação do TMB de cada amostra foram calculadas as porcentagens de inibição da oxidação do TMB em relação ao controle positivo (100% de oxidação do TMB). O valor de absorvância obtida pelo branco foi subtraído dos valores das demais amostras. Os cálculos foram realizados da seguinte forma:

$$\% \text{ de TMB oxidado} = [\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{branco}}] / \times 100$$

$$\% \text{ inibição da oxidação TMB} = 100 - \% \text{ de TMB oxidado}$$

Desse modo, de posse dos valores de inibição foi calculado o valor da concentração da substância que inibe 50% da oxidação do TMB através ácido hipoclorito ($\text{Cl}_{50}^{\text{HOCl}}$).

3.8.3. Efeito das substâncias sobre a atividade *scavenger* de H_2O_2

Para verificar se o ácido cafeico possui a atividade “scavenger” sobre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o composto fenólico e o extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) foi incubado juntamente com concentração conhecida de H_2O_2 que foi calculado através da medição da sua absorvância a 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Dypbukt et al., 2005). O efeito da eliminação do H_2O_2 pelas substâncias testadas foi avaliado pelo método de Yamaguchi et al. (2010), verificando a alteração da concentração do peróxido de hidrogênio no meio reacional, através da mensuração da oxidação da sonda luminol.

O ácido cafeico (0,0018 – 2,7 µg/ml) ou EEBBd (0,5 – 10 µg/ml) ou DMSO (0,02%; v/v, controle positivo) foram incubados com luminol (0,6 mmol/L) e com tampão borato (50 mmol/L; pH 9,5). A reação (200 µL) iniciou após a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 0,5 mmol/L) aos poços, e a oxidação do luminol foi medida em luminômetro LB 960 Centro (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha) durante 5 minutos à 37°C.

A partir dos perfis cinéticos deste ensaio de quimioluminescência em função do tempo obtiveram-se os valores de área integrada (área sob a curva) de 0 a 5 minutos. Esses valores de área integrada foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição (% I) promovida pelas diferentes concentrações das substâncias testes analisadas, em relação ao controle positivo (solvente), conforme já descrito no item 3.7.8. Desse modo, de posse dos valores de inibição foi calculado o valor da concentração da substância que inibe 50% da oxidação do luminol através peróxido hidrogênio ($CI_{50}^{H_2O_2}$).

3.8.4. Avaliação da atividade inibitória da enzima mieloperoxidase pelas substâncias (EEBBd e ácido cafeico) empregando a reação MPO- H_2O_2 -luminol

A enzima mieloperoxidase (MPO) isolada de leucócitos polimorfonucleares humanos (Calbiochem), na presença de H_2O_2 , é capaz de oxidar o luminol levando a produção de quimioluminescência (Figura 3.6). A atividade do EEBBd e do ácido cafeico sobre a QL^{MPO} , isto é, a quimioluminescência gerada pela reação MPO- H_2O_2 -luminol foi avaliada em um sistema livre de células segundo Costa et al. (2004).

Inicialmente, a atividade enzimática da MPO na solução estoque foi determinada através da leitura de absorvância em 655 nm durante o primeiro minuto de reação a 37 °C, em um meio contendo tampão fosfato 50 mmol/L pH 5,4, TMB (1,4 mmol/L), DMF (10%) e H_2O_2 (300 μ mol/L). Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de enzima necessária para degradar 1 μ mol de H_2O_2 por minuto a 37°C (Dyrbukt et al., 2005).

As soluções de H_2O_2 e de MPO foram preparadas em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L; sem Cl^- em pH 7.4 e 5.4; respectivamente. E as soluções de EEBBd e ácido cafeico foram preparadas em DMSO.

O EEBBd (0,0625 – 2,0 μ g/mL) ou ácido cafeico (0,48 – 15,6 ng/mL) ou inibidor da mieloperoxidase (*p*-aminobenzohidrazida -10 μ mol/L) ou DMSO (0,01%; v/v - controle) foram misturados com a enzima (MPO – 0,05 U/mL) e luminol (1,0 mmol/L) em tampão fosfato de potássio (50 mmol/L, sem Cl^- , pH 7.4) e incubados por 2 minutos a 37°C. A reação foi iniciada com a adição de H_2O_2 (50 μ mol/L) e realizada a quantificação da $QLlum^{MPO}$ durante 20 minutos a 37°C em luminômetro LB 960 Centro (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha), num volume final de reação de 200 μ L.

Os valores área integrada de $QLlum^{MPO}$ foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição (% I) promovida pelas diferentes concentrações das substâncias-testes analisadas, em relação aos respectivos controles, seguindo-se a fórmula:

$$\% I = 100 - [AS/AC] \times 100, \text{ onde:}$$

% I: porcentagem de inibição da $QLlum^{MPO}$ em relação ao controle

AS: área integrada de $QLlum^{MPO}$ de cada concentração da substância avaliada

AC: área integrada de $QLlum^{MPO}$ do controle (DMSO 0,1% ; v/v)

Na sequência, foram calculados os valores de CI_{50} , que é a concentração da substância-teste que inibe 50% da resposta biológica avaliada, por meio de uma regressão não linear

Figura 3.6: Esquema simplificado da produção de quimioluminescência pela reação MPO- H_2O_2 -luminol. (1): O H_2O_2 é convertido em água pela MPO (mieloperoxidase), gerando o intermediário composto I. (2): O composto I oxida o luminol, produzindo o composto II. (3): Oxidação do luminol pelo composto II, regenerando o sítio catalítico da enzima. (4): As reações 2 e 3 produzem luminol na forma de radical livre, que gera ânion aminofalato no estado eletronicamente excitado. (5): liberação fótons pelo intermediário quimicamente instável, ao retornar para o estado basal. Esquema original publicado e elaborado por Kabeya (2006), com permissão do autor.

3.8.5. Avaliação da interação entre o ácido cafeico e a MPO por *docking*

O estudo de modelagem molecular por docking foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Caliri e o aluno de doutorado Leandro Oliveira Bortot, ambos do laboratório de Física Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

As análises *in silico* por docking, inicialmente, foram validadas utilizando como controle positivo: SHA (Ácido salicil-hidroxiâmico); HX1; quercetina, ácido cafeico e ácido gálico (**Apêndice 1**). Já nas análises dos resultados, os dockings foram realizados utilizando como ligantes: os derivados do ácido cinâmico (*t*-cinâmico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeico); a molécula utilizada na validação (SHA) e o inibidor dos ensaios *in vitro* (ABAH – item 3.9.4).

Os dockings foram feitos com o programa AutoDock Vina (Trott, Olson; 2010) com valor de exaustividade 1000. O volume de busca compreendeu um heterodímero de cadeia pesada e leve da mieloperoxidase humana complexada ao inibidor não covalente HX1 (PDB ID 4C1M) (Forbes et al., 2013). As águas cristalográficas e inibidor HX1 foram removidos para a execução dos dockings.

O hardware usado foi composto por uma máquina virtual hospedada na infraestrutura de computação em nuvem da Universidade de São Paulo. Especificamente, foram usados 8 núcleos de processamento Intel a 2.40 GHz.

3.9. ENSAIOS EM SISTEMAS CELULARES

3.9.1. Análise de morte de neutrófilos tratados com EEBBd e ácido cafeico: Alteração de membrana por exclusão ao corante Azul de Tripan e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) - Necrose

A citotoxicidade do extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* e do ácido cafeico sobre os neutrófilos foi avaliada por meio de dois ensaios: o de exclusão ao corante Azul de Tripan, e o ensaio cinético *in vitro* para determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), conforme descrito por Lucisano-Valim et al. (2002). Os ensaios são baseados, respectivamente, na quantificação de células viáveis, as quais não foram coradas devido a ausência de alterações da integridade da membrana plasmática, assim como da liberação da enzima presente no citoplasma celular quando a célula não estava viável.

Os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$), purificados a partir de sangue periférico humano foram incubadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos, com o EEBBd do mês Maio/2007, nas concentrações finais de 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (amostras); ou ácido cafeico nas concentrações finais 150, 200, 300 e 500 $\mu\text{mol/L}$ (amostras); ou solvente (DMSO 0,1%; v/v – controle solvente); ou Hanks com 0,1% de gelatina; ou Triton X-100 (0,2%; v/v - controle positivo). O volume final de reação utilizado neste ensaio foi de 0,5 mL.

Após centrifugação a $1258 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , os sedimentos e sobrenadantes foram separados para a realização dos ensaios de exclusão ao Azul de Tripán e da atividade da enzima LDH, respectivamente.

Os sedimentos das células foram suspensos com 100 μL de solução de Hanks com gelatina 0,1%. Uma alíquota (10 μL) dessa suspensão foi adicionada a igual volume de Azul de Tripán (0,1% em NaCl) e transferida para câmara de Neubauer para a avaliação da viabilidade celular, em um microscópio óptico (modelo BX51, Olympus, Tóquio, Japão), onde foram analisadas 200 células e quantificadas as células que incorporam o corante (células inviáveis) (Freshney, 1994).

O sobrenadante foi analisado quanto à presença da enzima lactato desidrogenase (LDH) pelo emprego do kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil). A quantificação da atividade da enzima LDH – liberada de células inviáveis após o rompimento da membrana – de cada amostra foi determinada através da adição de uma alíquota de 100 μL do sobrenadante a 1 mL do reagente de trabalho – composto de piruvato, NADH e tampão específico – pré-aquecido a 37°C . A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH (ver a reação abaixo). A medida desta conversão é baseada no decréscimo da absorvância a 340 nm (devido a oxidação do NADH, a qual é proporcional a atividade da LDH na amostra) no tempo 1 e 3 minutos a 37°C em espectrofotômetro DU-70 (Beckman, Fullerton, CA, USA) (Kabeya, 2002). O valor da atividade da LDH nas amostras foi calculada de acordo com as instruções do fabricante do kit, onde:

$$\text{Atividade da LDH} = [\text{absorvância inicial} - \text{absorvância final}] / 2 \times 1,746$$

Absorvância inicial: 1º minuto; Absorvância final: 3º minuto.

Reação:

3.9.2. Verificação de efeito “quenching” nas amostras EEBBd e ácido cafeico

As sondas luminescentes apresentam uma banda de emissão de luz. No caso do luminol, o pico máximo observado encontra-se em 425 nm. Para a lucigenina há dois picos principais, um em torno de 450 nm e outro em 510 nm (Jiang et al., 2006).

O detector do luminômetro não é seletivo, e capta a luz emitida dentro de uma faixa de comprimento de onda (390 a 620 nm). Assim, a luz emitida pelas sondas precisa chegar totalmente ao detector para uma quantificação precisa e, caso as amostras tiverem a propriedade de absorver a luz na faixa de comprimento de onda de emissão das sondas (“quenching”), a quantidade de luz que chegará ao detector será menor, falseando os resultados. (Van Dyke; Castranova, 1987).

Desse modo, para verificar a adequabilidade, bem como uma possível interferência das substâncias estudadas (EEBBd e ácido cafeico) nos ensaios de quimioluminescência (QL) empregou-se um ensaio com a finalidade de avaliar o processo de “quenching”.

Nesse ensaio, uma alíquota (1mL) das substâncias acondicionadas em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico foram submetidas a uma varredura de 200 a 700 nm para a determinação do espectro de absorvância. As amostras foram preparadas nas mesmas condições dos ensaios de QL e analisadas em espectrofotômetro DU-70. Utilizou-se para essa análise solução de Hanks contendo DMSO a 0,1% (como branco) e as concentrações 50 µg/mL para o EEBBd e 90 µg/mL ácido cafeico.

3.9.3 Avaliação do efeito de diferentes estímulos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos: Ensaios de quimioluminescência (QL)

Neutrófilos (1×10^6 mL) foram incubados com o solvente (DMSO 0,1%; v/v), e as sondas quimioluminescentes luminol (100 µmol/L) ou lucigenina (100 µmol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foi adicionado os diferentes estímulos IC:IgG-OVA ou IC:IgG-OVA/SHN (ambos a 60µg/ml) ou PMA (10^{-7} mol/L) e, imediatamente, foi medida a QL em c.p.m (fótons contados por minuto) durante 15 minutos a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha).

A partir desta metodologia investigou os perfis de cada estímulo na produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por quimioluminescência (QL) dependente de lucigenina (QLluc^{PMN}) e da produção total de ERO por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}).

3.9.4. Análise do efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e PMA.

A atividade do extrato etanólico do bruto de *Baccharis dracunculifolia* e do ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos humanos foi avaliada conforme metodologia adaptada de Lucisano-Valim et al. (2002). Esta função celular foi avaliada através medida da produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por quimioluminescência (QL) dependente de lucigenina ($QLuc^{PMN}$) e da produção total de ERO por quimioluminescência dependente de luminol ($QLlum^{PMN}$) (Figura 3.7). A ativação específica do metabolismo oxidativo via receptores $Fc\gamma R$ ou $Fc\gamma R + CR$ (receptor de complemento) ou na ausência de receptores foi realizada empregando-se os seguintes estímulos IC IgG-OVA; IgG-OVA/SHN e PMA, respectivamente.

Em placas de 96 poços, foram adicionados os neutrófilos (1×10^6 mL), as substâncias-testes (EEBBd ou ácido cafeico) ou solvente (DMSO 0,1%; v/v), e as sondas quimioluminescentes luminol (100 μ mol/L) ou lucigenina (100 μ mol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foi adicionado os diferentes estímulos IC: IgG-OVA ou IC: IgG-OVA/SHN (ambos a 60 μ g/ml) ou PMA (10^{-7} mol/L) e, imediatamente, foi medida a QL em c.p.m (fótons contados por minuto) durante 15 minutos a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha).

A partir dos perfis cinéticos de $QLuc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ em função do tempo (Figura 3.8 A), foram calculados os valores de área integrada (área sob a curva) de 0 a 15 minutos (Figuras 3.8 B e C). No caso do ensaio de $QLuc^{PMN}$, este valor de área integrada representa a quantidade total de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido em 15 minutos, e, no caso do ensaio de $QLlum^{PMN}$, a quantidade total de ERO produzidas neste mesmo intervalo de tempo (Van Dyke; Castranova, 1987; Kabeya, 2002).

Esses valores de área integrada de $QLuc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição (% I) promovida pelas diferentes concentrações das substâncias-testes analisadas, em relação aos respectivos controles (Figura 3.8D), seguindo – se a fórmula:

$$\% I = 100 - [AS/AC] \times 100], \text{ onde:}$$

% I: porcentagem de inibição da $QLuc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ em relação ao controle

AS: área integrada de $QLuc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$, de cada concentração avaliada

AC: área integrada de $QLuc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ do controle (DMSO 0,1% ; v/v)

Na sequência, foram calculados os valores de CI_{50} , que é a concentração da substância-teste que inibe 50% da resposta biológica avaliada, por meio de uma regressão não linear (Figura 3.8E).

Figura 3.7: Representação simplificada da produção das principais ERO produzidas por neutrófilos estimulados, bem como da detecção das mesmas por meio de sondas quimioluminescentes (luminol e lucigenina), as quais são empregadas separadamente em procedimentos experimentais. A ligação de estímulos aos receptores de membrana da célula leva a formação do complexo NADH oxidase, o qual converte oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Este é convertido em H_2O_2 , que pode ser utilizado pela mieloperoxidase (MPO) para produção de ácido hipocloros (HOCl) e participar de outras reações, que leva à formação de diferentes produtos. As ERO derivadas do H_2O_2 podem ser detectadas pelo luminol, levando à produção da quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}; reações em azul); enquanto o ânion superóxido pode ser detectado pela lucigenina, levando à produção da quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc^{PMN}; reações em vermelho). Esquema elaborado por Kabeya (2006), com permissão do autor.

Figura 3.8: Representação das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade do EEbBd e do composto sintético ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos. A: Medida de $QLlum^{PMN}$ em função do tempo, produzida por neutrófilos estimulados com IC IgG-OVA, na presença de DMSO (controle) ou de diferentes concentrações das substâncias testes. **B:** representação da área integrada de $QLlum^{PMN}$, cujos valores são determinados para cada substância teste e do controle (**gráfico C**) e posteriormente utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição da $QLlum^{PMN}$ de cada concentração em relação com controle (DMSO) (**gráfico D**). **E:** cálculo do valor de CI_{50} de cada substância analisada, por meio de uma regressão não-linear. **Abreviaturas:** CI_{50} : concentração de inibe 50% da resposta biológica; **DMSO**: dimetilsulfóxido; **IC IgG-OVA**: imunocomplexo formado de OVA e IgG anti-OVA; **IgG**: imunoglobulina da classe G; **OVA**: ovalbumina; **$QLlum^{PMN}$** : quimioluminescência dependente de luminol. Esquema elaborado por Kabeya (2006), com permissão do autor.

3.9.5. Quantificação da expressão de receptores em neutrófilos tratados com EEBBd ou ácido cafeico

3.9.5.1. Receptores CD11b/CD18 (CR3)

Para avaliar a expressão total dos receptores CD11b/CD18, os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados com EEBBd (5; 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) ou ácido cafeico (5; 36 e 90 $\mu\text{g/mL}$) ou DMSO (0,2%; controle) durante 10 minutos a 37 °C, e estimulados com PMA (10^{-7} mol/L) por 5 minutos, cujo tempo de estimulação observa-se o pico de expressão deste receptor (Santos, 2014). Após os 15 minutos de incubação, as células foram lavadas por uma vez com PBS (pH 7.4) gelado e centrifugadas $750 \times g$ por 10 minutos à 4°C. Em seguida, as células foram suspensas com 200 μL de solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina e, posteriormente marcadas com anticorpo IgG₁-PE humano anti-CD11b (CR3; MAC clone ICRF44) ou com isotipo controle (IgG₁-PE *kappa*, clone MOPC-21) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalizados os 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de PBS gelado com 2% de SBF (soro bovino fetal) seguida de centrifugação ($750 \times g$, 10 minutos, 4°C). O sedimento foi suspenso em 100 μL de PBS pH 7.4 contendo 1% de formol, e a fluorescência das amostras foi lida em citômetro de fluxo, conforme descrito por Marzocchi-Machado et al. (2002). Os resultados foram expressos como MIF/célula.

3.9.5.2. Receptores CD16 (FcγRIIIb) e CD32 (FcγRIIa)

Os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados com EEBBd (5; 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) ou ácido cafeico (5; 36 e 90 $\mu\text{g/mL}$) ou DMSO (0,2%; controle) durante 15 minutos a 37 °C. Em seguida, adicionou-se os anticorpos anti-receptor específico marcados com fluorocromo ou o isotipo controle. A reação foi interrompida e a fluorescência das amostras foi avaliada conforme descrito no item 3.9.6.1

Os anticorpos utilizados nestes ensaios foram: IgG₁-PE humano anti-FcγRIII/CD16 (IgG₁ *kappa*; clone 3G8); IgG₁-PE humano isotipo para anti-CD16 (IgG₁ *kappa*; clone MOCPC-21); IgG₂b-FITC humano anti-FcγRII/CD32 (IgG₂b *kappa*; clone FLI 8.26); IgG₂b-FITC humano isotipo controle para anti-CD32 (IgG₂b *kappa*; clone 27-35).

3.9.5.3. Receptores CD282 (TLR 2) e CD284 (TLR 4)

Os neutrófilos (1×10^6 /mL) foram tratados com EEbBd (10 e 50 μ g/mL) ou ácido cafeico 36 e 90 μ g/mL) ou DMSO (0,2%; controle) durante 15 minutos a 37 °C. Após os 15 minutos de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS (pH 7.4) gelado e centrifugadas 750 $\times$ g por 10 minutos à 4°C. Em seguida, as células foram suspensas com 200 μ L com solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina e, posteriormente marcadas com anticorpo IgG2a-FITC humano anti-TLR2/CD282 (clone TL2.1) e IgG2a-PE humano anti-TLR4/CD284 (clone HTA 125) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como controles negativos foram empregados os IgG2a-FITC camundongo isotipo para anti-TLR2 (clone MOPC-173; IgG2a, *kappa*) e IgG2a-PE camundongo isotipo para anti-TLR4 (clone MOPC-173; IgG2a, *kappa*)

Finalizados os 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de PBS gelado com 2% de SBF (soro bovino fetal) seguida de centrifugação a 750 $\times$ g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em 100 μ L de PBS pH 7.4 contendo 1% de formol, e a fluorescência das amostras foi lida em citômetro de fluxo, conforme descrito por Marzocchi-Machado et al. (2002). Os resultados foram expressos como MIF/célula.

3.9.6. **Avaliação do efeito do EEbBd e ácido cafeico sobre atividade fagocítica de partículas de zimosan (ZI)**

A técnica de fagocitose foi realizada por citometria de fluxo de acordo com Sahlin et al. (1983) e Hed (1986) com modificações. Neutrófilos ($0,5 \times 10^6$ células) foram tratados com ácido cafeico (36 e 90 μ g/mL), extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* (10, 50, 200 μ g/mL), DMSO (0,2%; v/v) ou citocalasina D (10 μ mol/L) mantidos em incubadora tipo shaker a 200 rpm, 37°C por 30 minutos. Zimosan e marcado com isotiocianato de fluoresceína (ZI-FITC, 100 μ g/mL), preparado de acordo com o método descrito nos itens 3.6.2 e 3.6.3, respectivamente, foi adicionado aos tubos como estímulo fagocítico, seguindo-se a incubação a 37°C por mais 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 200 $\times$ g. Ao fim da lavagem as células foram suspensas em 200 μ L de PBS gelado e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto - software DIVA – Becton Dickinson, CA, EUA) na presença e ausência de Azul de Tripan

(1,8 mg/mL; pH 4.4). Os resultados foram apresentados em porcentagem de fagocitose de 10.000 eventos analisados em relação ao controle com DMSO.

3.9.7. Atividade microbica de neutrófilos, na presença de *Candida albicans*, pré-tratados com EEBd ou ácido cafeico:

Esse ensaio foi realizado de acordo com Twentyman e Luscombe (1987). Tubos contendo suspensões de neutrófilos (1×10^6 /mL) foram pré-incubados (37°C, 15 min) com diferentes concentrações do ácido cafeico (36 e 90 µg/mL), ou o solvente das amostras (DMSO a 0,1%; v/v), ou o tampão Hanks com gelatina a 0,1% (controle). Após incubação, foi adicionada uma suspensão da levedura *Candida albicans* (ATCC 64548) ($0,6 \times 10^6$ ufc/mL) e as células foram mantidas sob agitação (37°C, 133 rpm, 2 h). Após centrifugação (3220 xg, 5 min) e lavagem do sedimento, os neutrófilos foram lisados com Triton X-100 a 1% e a levedura foi lavada duas vezes com NaCl a 0,9%. Aos tubos foi adicionado 300µL da solução de 3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT- 0,5 mg/mL em tampão de RPMI), seguido de incubação (37°C, 4 h) ao abrigo da luz. Após centrifugação (3220 xg, 5 min) o sedimento foi dissolvido DMSO 100% e levemente agitado. Uma alíquota de 100µL foi transferida para placa de 96 poços e realizou-se a leitura da absorvância em 545 nm. Como controles do experimento, suspensões de *C. albicans* ($0,6 \times 10^6$ ufc/mL) foram incubadas com tampão Hanks contendo gelatina a 0,1% (controle positivo) e com duas concentrações de ácido cafeico (36 e 90 µg/mL) na ausência dos neutrófilos. Como branco, foi utilizado apenas solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão de RPMI). A absorvância referente ao branco foi subtraída das demais amostras.

3.10. Análise estatística

Os dados experimentais foram processados e analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, e comparados estatisticamente pelo teste *t* de Student ou pelo método de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, conforme indicado na legenda das figuras. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. ENSAIOS EM SISTEMAS NÃO CELULARES

4.1.1 Atividade antioxidante dos compostos presentes em EEBBd de Maio/07 frente ao radical DPPH

Para elucidar o mecanismo de ação da *Baccharis* responsável pela acentuada atividade inibitória do burst oxidativo de neutrófilos estimulados com zimosan opsonizado (Figueiredo, 2010) foi avaliado a capacidade de fenólicos, derivados do ácido cinâmico já identificados como presentes no extrato e de estruturas químicas diferentes (Park et al., 2003; De Sousa et al., 2009; Figueiredo-Rinhel et al., 2013), em reduzir o radical livre estável DPPH conforme descrito por Blois (1958) e modificado por Rodrigues e colaboradores (2002).

A diferença entre estes compostos compreende-se no número e posições de hidroxilas livres no grupo catecol. O ácido cafeico, dentre os quatros demais, é o único composto que apresenta duas hidroxilas, enquanto o ácido ferúlico tem uma das suas hidroxilas substituídas por um grupo metoxi. Por outro lado, o ácido *p*-cumárico detém apenas uma hidroxila no anel, diferindo do o ácido *t*-cinâmico, o qual é único composto que não apresenta hidroxila no grupo aromático (**Figura 4.1A**).

Os dados demonstram que o ácido *t*-cinâmico reduziu o DPPH de modo semelhante ao controle negativo (DMSO). Já o ácido *p*-cumárico mostrou efeito redutor de $15,94 \pm 2,29\%$, correspondente a cerca de cinco vezes menor que o controle positivo (quercetina). Por outro lado, os ácidos ferúlico e cafeico detiveram uma expressiva capacidade de reduzir o radical DPPH, sendo este efeito mais acentuado pelo ácido cafeico, que apresentou efeito antioxidante semelhante ao controle positivo (quercetina; 20 μ M), um flavonóide já caracterizado com uma elevada atividade antioxidante e cuja concentração tem-se o máximo de redução do mesmo radical analisado (Kabeya, 2002) (**Figura 4.1B**).

Figura 4.1: Efeito antioxidante dos compostos fenólicos sobre o radical livre do DPPH. **A:** Estruturas químicas dos compostos fenólicos e do flavonóide (quercetina) **B:** Porcentagem de redução do radical livre DPPH. As amostras foram incubadas com a solução de DPPH e sua redução foi avaliada através da medida de absorvância a 515nm. DMSO a 0,1% foi utilizado como solvente das amostras (controle negativo) enquanto o flavonóide quercetina foi utilizado como controle positivo. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison (* $P=0,001$; ** $P<0,0001$; *ns*: não significativo).

Diante deste último resultado, o ácido cafeico (2000 μ Mol/L) demonstrou ser um potente antioxidante, no entanto, foi necessário investigar se esse efeito também é dependente da concentração e comparar seu potencial redutor em relação ao extrato de EEbBd e a quercetina, através da obtenção do CI_{50} . Nesta etapa experimental, foi observado que o fenólico deteve um potencial redutor de modo dependente de concentração, obtendo um valor de CI_{50} igual a $5,87 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$. (**Figura 4.1.1**). Nota-se também que o efeito de redução máximo ($78,1 \pm 1,4\%$) foi obtido a partir 14,4 $\mu\text{g/mL}$ mantendo esse efeito até a concentração de 360 $\mu\text{g/mL}$, indicando um efeito platô no potencial redutor mediado por este produto natural. (Figura 4.2)

Na análise dos valores de CI_{50} o ácido cafeico, a quercetina e o EEbBd apresentaram valores de 5,87; 2,32 e 49,16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes valores demonstraram que o ácido cafeico apresenta uma atividade antioxidante cerca de 8 vezes maior do aquela apresentada pelo EEbBd; em contrapartida demonstrou efeito menor na redução do DPPH que do controle positivo (quercetina) (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1: Análise da capacidade de sequestrar o radical livre do DPPH pelo Extrato Etanólico Bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) e ácido cafeico

Substâncias	CI ₅₀ [μg/mL]	CI ₅₀ [μM]
EEBBd	49,16 ± 1,84	-----
Ácido cafeico	5,87 ± 0,15	32,59 ± 0,84
Quercetina	2,32 ± 0,27	7,68 ± 0,89

Concentração das substâncias que promoveram 50% de redução (CI₅₀) do radical livre do DPPH. Valores estão demonstrados como média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata.

Figura 4.2.: Ácido cafeico exibe um potencial *scavenger* do radical livre do DPPH dependente de concentração.

As amostras foram incubadas com a solução de DPPH e sua redução foi avaliada através da medida de absorvância a 515nm. DMSO a 0,1% foi utilizado como solvente das amostras. A barra listrada corresponde a concentração utilizada de 2000μM (360μg/mL) empregada na avaliação dos compostos fenólicos na atividade *scavenger*. Vide em métodos e casuística o cálculo realizado para obtenção da porcentagem de redução do radical livre DPPH. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison (* $P < 0,05$).

4.1.2. Efeito do ácido cafeico sobre a atividade “scavenger” de HOCl e H₂O₂

O radical DPPH e o ânion superóxido apresentam semelhanças quanto ao elétron desemparelhado na sua camada mais externa, o que os caracterizam como radical livre, sendo o ânion superóxido, um representante do grupo das espécies reativas de oxigênio (ERO). Entretanto, durante a ativação de neutrófilos diversas ERO são produzidas através da atividade das enzimas NADPH oxidase e MPO como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso (HOCl) entre outros. Assim, como foi demonstrado que o ácido cafeico deteve uma grande habilidade antioxidante frente ao DPPH, foi interessante investigar o seu potencial frente as outras ERO.

Para isso foi utilizado um sistema livre de células que permitiu avaliar o efeito scavenger do ácido cafeico sobre ácido hipocloroso (HOCl), através da medida da absorvância do composto colorido, resultante da reação química entre o TMB e taurina-cloramina, cuja último composto é o produto gerado entre o HOCl residual e a taurina. Inicialmente, o ácido cafeico foi incubado juntamente com uma concentração conhecida de HOCl (presente na água sanitária comercial - ASC).

Neste ensaio foi possível observar que quanto maior a concentração do ácido cafeico menos TMB foi oxidado (**Figura 4.3A**). De posse dos valores de absorvância das diferentes concentrações da amostra e do controle foram calculados as porcentagens de inibição da oxidação do TMB, cujos resultados estão indicados na **Figura 4.3B**. Os dados apontam que o composto fenólico deteve um efeito scavenger do ácido hipocloroso de forma dependente da concentração, obtendo um valor de CI_{50} igual a $1,50 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$. Diante deste último resultado, observou-se que o ácido cafeico apresentou uma atividade scavenger do HOCl cerca de 2,5 vezes maior que a do EEBBd (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2: Análise do efeito *scavenger* de HOCl pelo Extrato Etanólico Bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) e ácido cafeico

Substâncias	CI ₅₀ [μg/mL]	CI ₅₀ [μM]
EEBBd	4,0 ± 0,10	----
Ácido cafeico	1,5 ± 0,22	8,33 ± 1,23

Concentração das substâncias que promoveram 50% de inibição (CI₅₀) da oxidação do TMB. Valores demonstrados como média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata

Figura 4.3: Ácido cafeico exerce maior efeito antioxidante sobre o ácido hipocloroso do que o EEBBd. **A:** Valores de absorvância referentes à oxidação do TMB pela taurina-Cl formada através da interação da taurina com HOCl residual após tratamento do HOCl com as diferentes concentrações do ácido cafeico. **B:** Valores de porcentagem de inibição da oxidação do TMB referentes às diferentes concentrações do ácido cafeico após interação com o HOCl presente no meio. A porcentagem de inibição foi calculada em relação a absorvância do controle positivo (DMF 0,06% - no lugar da amostra). Resultados expressos como média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison (* $P < 0,05$). # representa amostra estatisticamente distinta ao controle solvente (DMF) e * representa amostras estatisticamente distintas entre si.

Sobre a mesma perspectiva, também se utilizou um sistema livre de células para verificar se o ácido cafeico e o EEBBd possuem efeito “scavenger” sobre o H₂O₂. Neste ensaio o peróxido de hidrogênio oxida a sonda luminol gerando fótons, os quais são quantificados por quimioluminescência. As substâncias foram incubadas com H₂O₂ e, posteriormente, a QLlum foi quantificada.

Os resultados deste ensaio apontaram que o EEBBd e o composto fenólico detiveram de maneira dependente de concentração uma atividade sequestradora do peróxido de hidrogênio fornecendo valores de CI₅₀^{H₂O₂} de 1,30 ± 0,12 e 0,072 ± 0,008, respectivamente.

Novamente, o ácido cafeico demonstrou maior atividade scavenger do substrato da MPO, com um CI_{50} 18 vezes menor que o do EEBBd (**Figura 4.3, Tabela 4.3**).

Tabela 4.3: Análise do efeito *scavenger* de H_2O_2 pelo Extrato Etanólico Bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) e ácido cafeico

Substâncias	CI_{50} [$\mu g/mL$]	CI_{50} [μM]
EEBBd	$1,30 \pm 0,12$	----
Ácido cafeico	$0,072 \pm 0,008$	$0,4 \pm 0,05$

Concentração das substâncias que promoveram 50% de inibição (CI_{50}) da oxidação do luminol através do peróxido de hidrogênio. Valores estão demonstrados como média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata.

Figura 4.4: Ácido cafeico exerce maior efeito antioxidante sobre o peróxido de hidrogênio do que o EEBBd. Valores de porcentagem de inibição da oxidação do luminol (600 $\mu Mol/L$) referentes às diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* (A) e do ácido cafeico (B) após interação com o H_2O_2 presente no meio. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle positivo (dimetilsulfóxido - DMSO; 0,02% (A) ou 0,009% (B) no lugar da amostra) de cada experimento. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison (* $P < 0,05$, ns: não significativo).

4.1.3. Análise da inibição da atividade peroxidativa da enzima mieloperoxidase (MPO) pelas substâncias (EEBBd e ácido cafeico) no sistema MPO- H_2O_2 -luminol

O produto enzima NADPHoxidase é dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) originando o H_2O_2 , o qual na presença da mieloperoxidase (MPO) e íons cloro (Cl^-) forma ácido hipocloroso ($HOCl$) com alta atividade microbica (Santos, 2010).

Assim, como confirmado anteriormente a habilidade antioxidante do ácido cafeico tanto sobre o substrato (H_2O_2) quanto no produto (HOCl) da enzima MPO, passou-se investigar se o fenólico interferiria na atividade enzimática da mesma.

Para isso, empregou-se um ensaio de quimioluminescência (QL) dependente de luminol, o qual foi executado em um sistema livre de células, contendo apenas a enzima MPO purificada e adquirida comercialmente.

Os dados obtidos apontam que o EEbBd apresentou um efeito inibitório da QL^{MPO} dependente da concentração. A partir da concentração de $0,25 \mu\text{g/mL}$ o extrato vegetal foi capaz de inibir $40,4 \pm 8,7 \%$ da QL^{MPO} produzida. Na maior concentração ($2,0 \mu\text{g/mL}$) investigada, o EEbBd atingiu sua capacidade máxima de inibição da atividade da QL^{MPO} ($95,0 \pm 1,1\%$), sendo essa semelhante ao controle positivo (inibidor da enzima, ABAH) (Figura 4.4A).

O ácido cafeico também demonstrou uma inibição da QL^{MPO} dependente de concentração, sendo o efeito inibitório mais acentuado (Figura 4.4B).

Portanto, essa inibição foi mais pronunciado pelo fenólico, cujo valor de $\text{CI}_{50}^{\text{QL MPO}}$ foi igual a $0,0563 \pm 0,0031 \mu\text{g/mL}$, que é 5,6 vezes menor ao obtido pelo EEbBd: $0,316 \pm 0,054 \mu\text{g/mL}$.

Figura 4.5: Ácido cafeico exibe maior potencial inibitório na atividade enzimática da MPO do que o EEbBd. Valores de porcentagem de inibição da atividade peroxidativa da enzima mieloperoxidase (MPO) por diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* - EEbBd (A) e do ácido cafeico (B) foram incubados com MPO ($0,05\text{U/mL}$) e luminol ($1,0 \text{ mmol/L}$). A reação foi iniciada com adição de H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) e mensurada a QL durante 20 minutos a 37°C . A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle positivo (DMSO). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Tukey's Multiple Comparison (* $P < 0,05$), ns: não significativo. ABAH: Inibidor da mieloperoxidase (*p*-aminobenzohidrazida; $10 \mu\text{mol/L}$)

4.1.4. Avaliação da interação da MPO com os compostos fenólicos presentes no EEBBd, por docking

Com o objetivo de confirmar o resultado da QL^{MPO} e esclarecer as possíveis interações da enzima com o ácido cafeico e dos compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico presentes no EEBBd, empregou-se uma avaliação *in silico*, por docking.

Na **Figura 4.6** estão apresentados as estruturas químicas dos compostos analisados e dos inibidores da enzima já listados na literatura, para a validação das análises (**Apendice 1**). A análise com o inibidor (ABAH), utilizado nos ensaios *in vitro* com a enzima MPO, e por diferir na estrutura química em relação aos compostos anteriores será comparada ao inibidor SHA.

Figura 4.6: Estrutura química dos ligantes empregadas no docking com a enzima MPO. (A) Compostos derivados do ácido cinâmico, presentes no EEBBd. (B) Estrutura do ligante SHA, usado na validação das análises, e do ABAH, usado nos experimentos *in vitro*.

Os resultados obtidos nessa análise molecular mostraram três possíveis modos de interação entre o ácido cafeico e o sítio ativo da MPO: (i) ligações de hidrogênio com His-95 e Arg-239; (ii) ligações de hidrogênio simultâneas com Gln-91, His-95 e Arg-239 e (iii) interação direta da porção carboxílica com o átomo de ferro no grupo heme (**Figuras 4.7 A-E**). As ligações de hidrogênio acontecem profundamente no sítio catalítico da MPO e revelando o empilhamento do anel do ácido cafeico com um dos anéis do heme. Além disso, foi visto um modo de interação “lateral” fora do sítio ativo com os resíduos Arg-333 e Arg-424 e que também obstrui a entrada no sítio da enzima (**Figuras 4.7 F,G,J**).

Figura 4.7: Modos de interação observados entre o ácido caféico e a enzima MPO. (A) Ligação de hidrogênio com His-95 e Arg-239; (B) Ligação de hidrogênio com Gln-91, His-95 e Arg-239; (C) Mesma interação que em “b”, mostrando também o heme sem o ferro. Note o empilhamento de anéis entre ácido caféico e heme; (D) Interação direta do ácido com o ferro do grupo heme; (E) Mesma interação que em “d”, mostrando também o heme. Nesse modo de interação não há empilhamento de anéis. (F) Modo de interação “lateral” através de ponte salina entre o ácido caféico e os resíduos Arg-333 e Arg-424. (G) Mesma interação mostrada em “f” em outro ângulo. (H) Entrada do sítio ativo na ausência de ligantes. O grupo heme está mostrado como esferas amarelas e o ferro em laranja. A superfície cinza representa a superfície da proteína. (I) Entrada do sítio ativo na presença de ácido caféico interagindo com o sítio ativo através de seus OH. Note que o ácido caféico bloqueia o acesso ao sítio. (J) Entrada do sítio ativo da presença de ácido caféico interagindo lateralmente com Arg-333 e Arg-424. Note que nesse modo de interação a entrada do sítio também é bloqueada. Resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio estão representados em vermelho, azul, branco, respectivamente.

Na análise com ácido *p*-cumárico, por deter apenas uma hidroxila no anel aromático, foram observados dois modos de interação através de ligações de hidrogênio (His-95, Arg-239 e Gln-91, His-95), as quais o ácido cafeico também estabelece, contudo não estabelecendo as interações simultâneas com estes três resíduos, devido à ausência do segundo grupo de hidroxila no anel da substância (**Figura 4.8**). Além disso, houve também a interação direta da porção carboxílica com o ferro do grupo heme, bem como, a interação lateral ao sítio ativo através de ponte de salina com os mesmos resíduos (Arg-333 e Arg-424) observados na interação com o ácido cafeico (dados não mostrados).

Figura 4.8: Modos de interação observados entre o ácido *p*-cumárico e a enzima MPO. (A) Ligações de hidrogênio com resíduos His-95 e Arg-239. **(B)** Ligações de hidrogênio com Gln-91 e His-95.

No caso do ácido ferúlico, foi observado apenas um modo de interação no qual há ligações de hidrogênio com His-95 e Arg-239. Isso se deve ao fato de que, em comparação do ácido cafeico, há uma substituição do grupo hidroxila da posição *orto* do anel por um grupo metoxi, não permitindo que a molécula se encaixe na cavidade do sítio ativo na orientação necessária para que o oxigênio haja como aceptor de hidrogênio da Gln-91 (**Figura 4.9**). Também foram observados os modos de interação direta com o ferro do grupo heme e a interação lateral ao sítio, através de ponte salina com os resíduos Arg-333 e Arg-424 (dados não mostrados).

Figura 4.9: Modo de interação observado entre o ácido ferúlico e a enzima MPO. Nesse caso apenas foi observado o modo de interação no qual há ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo His-95 e Arg-239.

Já na análise *in silico* com o ácido *t*-cinâmico, cujo composto não apresenta em sua estrutura os grupos de hidroxilas no anel, não se observou ligações de hidrogênio. Contudo, foi obtido o modo de interação no qual seu anel aromático encontra-se na mesma pose dos anéis dos outros ácidos anteriormente analisados (**Figura 4.10**). Embora não haja ligações de hidrogênio, esta orientação do anel é estabilizada, majoritariamente, pelo empilhamento do seu anel com um dos anéis do grupo heme (dados não mostrados).

Figura 4.10: Modo de interação observado entre ácido *t*-cinâmico e a enzima MPO. O anel do composto se orienta da mesma forma que os outros ácidos analisados, embora não havendo ligações de hidrogênio.

O inibidor empregado nos ensaios *in vitro* da QL^{MPO}, o ácido 4-aminobenzoico (ABAH), revelou-se dois modos de interação: (i) ligações de hidrogênio simultâneas com os resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239, e (ii) ligações de hidrogênio simultâneas com Gln-91 e uma com His-95. (**Figura 4.11 A,B**). As interações com os resíduos do sítio ativo com ABAH demonstraram serem semelhantes àsquelas obtidas com o SHA. No entanto, devido a ausência de grupo hidroxila no anel do ABAH, este inibidor estabelece menos interações do que o SHA, o qual em uma única pose é capaz de estabelecer uma ligação de hidrogênio adicional e ligações simultaneamente com os resíduos His-95, Gln-91 e Arg-239 (**Figura 4.11 C,D**).

Figura 4.11: Modos de interação observados com os inibidores ABAH e SHA e a enzima MPO. (A) Ligações de hidrogênio com Gln-91, His-95 e Arg-239. (B) Ligações de hidrogênio com Gln-91 e His-95. (C) Na comparação, o modo de interação do SHA é mais favorável, demonstrando as ligações de hidrogênio com Gln-91, His-95, Arg-239. Note que, apesar da semelhança entre as moléculas (ABAH e SHA), o grupo hidroxila no anel aromático do SHA fornece um ponto de interação adicional com os resíduos do sítio ativo.

Em suma, o conjunto de dados experimentais obtidos nos ensaios livre de células nos permitem concluir que, as amostras aqui estudadas apresentaram um potencial antioxidante que envolve atividade *scavenger* e efeito inibitório da MPO, sendo o ácido cafeico o composto que apresentou maior efeito em todos os ensaios analisados. Além disso, nas análises *in silico* foi confirmado que este maior efeito é devido a interação deste composto com a enzima MPO.

4.2. ENSAIOS EM SISTEMAS CELULARES

A próxima etapa deste trabalho foram investigadas a ação antioxidante das amostras (EEBBd e ácido cafeico) em um sistema biológico, constituído por neutrófilos, os quais apresentam elevada capacidade de produzir ERO, e maior concentração de MPO.

4.2.1. Atividade citotóxica do EEBBd e do ácido cafeico sobre os neutrófilos – Avaliação pela exclusão ao Azul de Tripán e mensuração da atividade enzimática (LDH)

Inicialmente foi avaliado se os compostos poderiam ser tóxicos para os neutrófilos, com o intuito de delimitar o grau de citotoxicidade de cada substância para a viabilização dos próximos ensaios celulares.

Os dados mostram que a concentração de 50 µg/mL do extrato vegetal não apontou efeito tóxico sobre neutrófilos humanos, apresentando altos valores percentuais de viabilidade celular ($95,95 \pm 2,73\%$) e baixa taxas de LDH liberada ($4,39 \pm 1,38\%$), valores semelhantes aos controles negativo e solvente.

Vale ressaltar que, embora as concentrações elevadas do extrato vegetal (100 a 200 µg/mL) se divergiram estatisticamente aos controles do ensaio nos parâmetros escolhidos para esta análise, nota-se que a substância não é extremamente tóxica, pois se observou que as taxas de viabilidade celular e a porcentagem de LDH liberada não excederam os valores de 87,0 e 17,0%, respectivamente. (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4 - Viabilidade celular e atividade da enzima LDH resultantes do tratamento dos PMNs com Extrato Etanólico Brutos de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) referente ao mês de Maio/07.

Amostras ^(a)	Células Viáveis (%) ^(b)	Atividade LDH (U/10 ⁶ cél/L)	LDH liberada (% controle+) ^(c)
Controle +	0,00	0,2822 ± 0,0379	100,00
Controle –	95,82 ± 1,88	0,0192 ± 0,0063	6,78 ± 2,23
DMSO	96,12 ± 1,08	0,0192 ± 0,0044	7,01 ± 1,76
EEBBd 50 µg/mL	95,95 ± 2,73	0,0217 ± 0,0014	4,39 ± 1,38
EEBBd 100 µg/mL	92,50 ± 0,80*	0,0425 ± 0,0076*	16,35 ± 2,76*
EEBBd 150 µg/mL	88,85 ± 1,93*	0,0429 ± 0,0066*	16,48 ± 3,17*
EEBBd 200 µg/mL	87,27 ± 3,64*	0,0463 ± 0,0092*	17,63 ± 3,35*

Tabela 4.5 - Viabilidade celular e atividade da enzima LDH resultantes do tratamento dos PMNs com ácido cafeico (C₉H₈O₄) .

Amostras ^(a)	Células Viáveis (%) ^(b)	Atividade LDH (U/10 ⁶ cél/L)	LDH liberada (% controle+) ^(c)
Controle +	0,00	0,2831 ± 0,0631	100,00
Controle –	95,31 ± 0,96	0,0210 ± 0,0047	7,56 ± 1,53
DMSO	96,00 ± 1,00	0,0181 ± 0,0035	6,70 ± 1,54
Ác. Cafeico 27 µg/mL	96,31 ± 0,96	0,0143 ± 0,0025	5,75 ± 1,31
Ác. Cafeico 36 µg/mL	95,75 ± 0,60	0,0150 ± 0,0035	5,94 ± 1,31
Ác. Cafeico 54 µg/mL	96,61 ± 0,60	0,0196 ± 0,0032	7,36 ± 1,78
Ác. Cafeico 90 µg/mL	96,56 ± 0,68	0,0208 ± 0,0053	7,85 ± 1,91

Neutrófilos (1x10⁶células/mL) incubados com (a) Triton X-100 0,2% (controle positivo), ou HBBS com gelatina 0,1% (controle negativo), ou DMSO 0,1% (controle solvente), ou EEBBd (50; 100; 150 e 200 µg/ml) ou ácido cafeico (27; 36; 54 e 90 µg/ml). (b) Determinado pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán, com base na contagem de 200 células. (c) Calculado em relação do controle positivo (100% de lise), onde as células foram lisadas com 0,2% de Triton X-100. Amostras analisadas estatisticamente em relação aos controles negativo e solvente. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos com medidas em duplicatas. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison (* $p < 0,05$).

Os mesmos ensaios foram realizados com o ácido cafeico. Por sua vez, todas as concentrações do fenólico (27 a 90 µg/mL) empregadas no ensaio não apresentaram nenhum efeito tóxico sobre as células, detendo altos valores de células viáveis e baixos níveis de atividade da LDH, sendo que os valores não são estatisticamente diferentes dos obtidos no controle negativo ou solvente (**Tabela 4.5**).

Diante destes resultados, estabelecemos como concentrações máximas do EEBBd e do ácido cafeico de 50 e 90 µg/mL, respectivamente.

4.2.2. Efeito “quenching” do EEBBd e do ácido cafeico

Este ensaio foi realizado com o objetivo de investigar se as substâncias poderiam apresentar um efeito ‘quenching’, isto é, absorver a luz na faixa de comprimento de onda de emissão das sondas luminol e lucigenina utilizadas nos ensaios de quimioluminescência (QL) nas análises celulares *in vitro*.

Como pode ser observado na figura 4.12, tanto o EEBBd quanto o ácido cafeico não apresentaram absorvância nos comprimentos de onda de 425 nm (pico máximo de emissão do luminol), 450 e 510 nm (picos principais de emissão da lucigenina), desta forma pode-se afirmar as ambas substâncias não exercem efeito sobre as sondas, assegurando que o efeito observado no ensaio de QL será exclusivo do composto sobre a célula.

Figura 4.12: EEBBd e ácido cafeico não exercem efeito sobre as sondas quimioluminescentes. Espectro de varredura de 200 nm a 700 nm das amostras de EEBBd (A; 50 µg/mL) e ácido cafeico (B; 90 µg/mL).

4.2.3 Efeito de diferentes estímulos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos: Ensaios de quimioluminescência (QL)

A ativação de neutrófilos com diferentes estímulos, como os solúveis (fatores quimiotáticos, citocinas, estímulos orgânicos) ou com os insolúveis (imunocomplexos -ICs), desencadeiam o metabolismo oxidativo nessas células, havendo a produção de ERO tanto no meio intracelular quanto no extracelular (Cascão et al., 2010; Amulic et al., 2012).

Desse modo, objetivo deste ensaio foi avaliar a diferença dos estímulos (PMA, IC e IC-SHN) na capacidade de promover a produção de ERO sobre os neutrófilos. Este ensaio inicial nos permitirá analisar uma possível relação entre a produção de ERO e concentração das substâncias aqui estudadas, o que caracterizará um efeito exclusivamente *scavenger*.

Figura 4.13: Análise do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com PMA, IC e IC-SHN. Neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram ativados com PMA (10^{-7} M) ou IC ou IC-SHN (ambos $60 \mu\text{g/ml}$) e a produção de ERO foi quantificada nos ensaios de quimioluminescência (QL). Valores de área integrada obtidos somente na presença do solvente (DMSO) nos ensaios de QL dependente de lucigenina (**A**) e de luminol (**B**). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão com análise estatística de teste t (** $p < 0,0001$; * $p = 0,0078$).

Os dados demonstraram que nos ensaios de QL, o burst oxidativo de neutrófilos apresentou diferenças na quantidade de ERO produzida em relação aos estímulos aplicados. Na figura 4.13A foi utilizada a sonda lucigenina, a qual pode ser oxidada exclusivamente pelo ânion superóxido, e foi observado que o estímulo solúvel (PMA) promoveu maior geração de ERO, em relação aos estímulos particulados (IC, IC-SHN). Entretanto, quando os ICs foram opsonizados com soro humano normal, a área integrada de QLluc foi maior do que a dos ICs não opsonizados. Na figura 4.13B foi utilizada a sonda luminol que é capaz de sofrer oxidação por diferentes ERO, porém o padrão de produção de ERO foi o mesmo observado

na figura 4.13A. Ambas as figuras mostraram que a ordem no potencial de produção de ERO foi PMA > IC-SHN > IC. Além disso, foi possível observar que a sonda luminol gerou maior área integrada de QL.

4.2.4. Avaliação do efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados

Em conjunto de todos os resultados até agora descritos, o ácido cafeico apresentou efeito antioxidante através do sequestro de ERO, bem como da inibição da enzima MPO, os quais contribuem para o metabolismo oxidativo de neutrófilos. De acordo com esta consideração foi avaliado o efeito das amostras sobre o burst oxidativo de neutrófilos desencadeado por diferentes estímulos.

4.2.4.1. Estímulo independente de receptores – PMA

Inicialmente, investigou-se o efeito das substâncias (EEBBd e ácido cafeico) no burst oxidativo, desencadeado por um estímulo solúvel e independente de receptor. Nesta etapa experimental, foram testadas concentrações de 0,3125 a 50,0µg/mL para EEBBd e, 0,0281 a 36,0µg/mL para ácido cafeico, e a partir desses resultados foram calculados os valores de CI_{50} das substâncias analisadas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.

Os resultados mostraram que o EEBBd foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração a produção de ERO totais e do ânion superóxido (**Figura 4.14 A,B**). Além disso, na máxima concentração (50µg/mL) aplicada neste ensaio o EEBBd foi mais eficiente em inibir a produção de ERO totais ($93,93 \pm 1,88\%$) do que a de ânion superóxido ($88,69 \pm 4,5\%$) (**Figura 4.14 A,B**).

O ácido cafeico também foi capaz de inibir as produções de ânion superóxido e de ERO totais desencadeado pelo PMA de maneira dependente de concentração (**Figura 4.14 C,D**). Além disso, na máxima concentração (36µg/mL) o fenólico foi capaz de inibir de modo semelhante tanto a produção do ânion superóxido ($79,64 \pm 3,66\%$) quanto de ERO totais ($78,84 \pm 4,35\%$) (**Figura 4.14 C,D**).

O ácido cafeico apresentou valores de CI_{50} para QLlum menores que os do EEBBd: $2,27 \pm 0,39\mu\text{g/mL}$ e $3,46 \pm 0,54\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O mesmo ocorreu com os valores de CI_{50} para QLluc: $0,258 \pm 0,09\mu\text{g/mL}$ e $1,34 \pm 0,16\mu\text{g/mL}$.

Figura 4.14: Ácido cafeico apresenta um maior efeito inibitório na produção de ERO totais e de ânion superóxido de neutrófilos estimulados com PMA que o EEBBd. Neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) na presença de diferentes concentrações (0,3125 - 50,0 $\mu\text{g/mL}$) de EEBBd Maio/2007 (**A, B**) ou com diferentes concentrações (0,0281 - 36,0 $\mu\text{g/mL}$) de ácido cafeico (**C, D**) foram estimulados com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA - 0,1 μM) e quantificado a produção de ânion superóxido (lucigenina **B, D**) e de ERO totais (luminol **A, C**) em ensaios de quimioluminescência (QL). O solvente das amostras foi utilizado o controle positivo (DMSO a 0,1%). Valores percentuais de inibição estão demonstrados como média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison (* $p < 0,05$)

4.2.4.2. Estímulo dependente de receptor $Fc\gamma R$ – Imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA)

A fim de se avaliar o efeito do EEBBd e do ácido cafeico no *burst* oxidativo desencadeado por um estímulo dependente do receptor de reconhecimento da porção Fc de imunoglobulinas da classe IgG ($Fc\gamma R$), foi empregados PMNs estimulados com imunocomplexos formados por ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA). Para isso, a mensuração da quantidade de ânion superóxido e ERO totais produzidos pelas células segue os mesmos procedimentos e parâmetros utilizados nos ensaios anteriores de quimioluminescência.

Dentre os resultados alcançados, nota-se o EEBBd foi capaz de inibir de modo dependente de concentração tanto a produção do ânion superóxido quanto de ERO totais. Na concentração máxima do extrato (50 μ g/mL) o efeito inibitório de QLluc e QLlum foram semelhantes, apontando valores de inibição iguais à $88,3 \pm 2,67\%$ e $90,1 \pm 1,83\%$, respectivamente (**Figura 4.15 A,B**).

O ácido cafeico também foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração tanto a produção do ânion superóxido quanto de ERO totais. Na concentração máxima do fenólico (54 μ g/mL) também se observa a inibição semelhante em ambas as produções analisadas, apresentando valores inibitórios iguais à $80,7 \pm 2,55\%$ e $78,1 \pm 3,2\%$, para os ensaios de QLluc e QLlum, respectivamente (**Figura 4.15 C,D**).

Na análise comparativa dos valores de CI_{50} , verificou-se que o extrato vegetal e o composto fenólico apresentam potenciais antioxidantes semelhantes no contexto de reduzir a quantidade de ânion superóxido, apontando valores de CI_{50}^{QLluc} iguais a: $4,38 \pm 0,55$ e $4,70 \pm 1,01\mu$ g/mL, respectivamente. Em contrapartida, o efeito antioxidante sobre as ERO totais foi maior em PMNs tratados com o ácido cafeico (CI_{50}^{QLlum} : $2,17 \pm 0,53 \mu$ g/mL) do que com EEBBd (CI_{50}^{QLlum} : $3,81 \pm 0,53\mu$ g/mL).

Figura 4.15: Ácido cafeico apresenta somente maior inibição na produção de ERO totais de neutrófilos estimulados com imunocomplexos (ICs) quando comparado ao EEBBd. Neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) na presença de diferentes concentrações (0,3125 - 50,0 μg/mL) de EEBBd Maio/2007 (**A, B**) ou com diferentes concentrações (0,09 - 54,0 μg/mL) de ácido cafeico (**C, D**) foram estimulados com imunocomplexo (IC - 60 μg/ml) e quantificado a produção de ânion superóxido (lucigenina **B, D**) e de ERO totais (luminol **A, C**) em ensaios de quimioluminescência (QL). O solvente das amostras foi utilizado o controle positivo (DMSO a 0,1%). Valores percentuais de inibição estão demonstrados como média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison (* $p < 0,05$)

4.2.4.3. Estímulo dependente de receptores $Fc\gamma R$ e CR– Imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA) opsonizado com soro humano normal (SHN)

Na continuidade da análise do efeito inibitório do EEBBd e do ácido cafeico sobre metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, neste caso, estimulados via receptores $Fc\gamma R$ e CR utilizou-se imunocomplexos formados pela ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA) opsonizados com um pool de soro humano de indivíduos saudáveis (SHN). Para isso, a mensuração da quantidade de ânion superóxido e ERO totais produzidos pelas células segue os mesmos procedimentos e parâmetros utilizados nos ensaios anteriores de quimioluminescência.

Os dados experimentais apontam o extrato da *Baccharis* inibe de maneira dependente de concentração tanto a produção de ERO totais quanto de ânion superóxido. A concentração máxima do EEBBd (50 μ g/mL) inibiu de modo semelhante quimioluminescência, apontando valores de inibição iguais à $83,5 \pm 29\%$ e $83,1 \pm 2,4\%$ para os ensaios de QLluc e QLlum, respectivamente (**Figura 4.16 A,B**).

O ácido cafeico também foi capaz de inibir de modo dependente de concentração tanto a produção de ânion superóxido quanto de ERO totais (**Figura 4.16 C,D**). Além disso, também se observa que este composto é mais eficaz em inibir a geração de ânion superóxido (cerca de 86,4% com 90 μ g/mL) do que a de ERO totais (cerca de 61,7% com 90 μ g/mL).

Na comparação dos valores de CI_{50} , o EEBBd e o ácido cafeico apresentaram o mesmo potencial antioxidante no contexto de reduzir a quantidade de $O_2^{\bullet-}$ detendo valores de CI_{50}^{QLluc} iguais a: $7,45 \pm 0,91$ e $7,80 \pm 1,52\mu$ g/mL, respectivamente. Por outro lado, o papel antioxidante a cerca das ERO totais se fez mais acentuado em PMNs incubados com o EEBBd (CI_{50}^{QLlum} : $11,97 \pm 1,20\mu$ g/mL) do que com o fenólico (CI_{50}^{QLlum} : $50,86 \pm 4,11\mu$ g/mL).

Figura 4.16: EEBBd apresenta maior efeito inibitório que o ácido cafeico somente na produção de ERO totais de neutrófilos estimulados com imunocomplexos opsonizados (IC-SHN). Neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) na presença de diferentes concentrações (2,5 - 50,0 $\mu\text{g/mL}$) de EEBBd Maio/2007 (**A, B**) ou com diferentes concentrações (1,80 - 90,0 $\mu\text{g/mL}$) de ácido cafeico (**C, D**) foram estimulados com imunocomplexo (IC - 60 $\mu\text{g/mL}$) de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina (IgG-OVA) opsonizado com soro humano normal (SHN) e quantificado a produção de ânion superóxido (lucigenina **B, D**) e de ERO totais (luminol **A, C**) em ensaios de quimioluminescência (QL). O solvente das amostras foi utilizado o controle positivo (DMSO a 0,1%). Valores percentuais de inibição estão demonstrados como média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison (* $p < 0,05$)

O conjunto de dados desta etapa experimental demonstra que as amostras aqui estudadas apresentaram perfis inibitórios dependentes da concentração, porém com valores de CI_{50} distintos em relação aos estímulos empregados na ativação dos neutrófilos humanos. Isto por que, o potencial antioxidante do ácido cafeico se sobressaiu ao do EEBBd quando os neutrófilos foram estimulados com PMA ou IC. (**Figura 4.17** e **Tabela 4.6**).

Além disso, de modo surpreendente, não se observou uma relação entre a concentração inibitória de cada substância (CI_{50}) e a produção de ERO desencadeada pelos diferentes estímulos (**Figuras 4.13** e **Tabela 4.6**).

Tabela 4.6: Valores de CI_{50} obtidos pelos ensaios de quimioluminescência dependentes de lucigenina (LUC) e de luminol (LUM), por diferentes estímulos.

Substâncias Estímulo	EEBBd		Ácido cafeico	
	$CI_{50} LUC$ [$\mu g/mL$]	$CI_{50} LUM$ [$\mu g/mL$]	$CI_{50} LUC$ [$\mu g/mL$]	$CI_{50} LUM$ [$\mu g/mL$]
Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)	$3,46 \pm 0,54$	$1,34 \pm 0,16$	$2,27 \pm 0,39$	$0,258 \pm 0,09$
Imunocomplexo (IgG anti-OVA+OVA)	$4,38 \pm 0,55$	$3,81 \pm 0,85$	$4,70 \pm 1,01$	$2,17 \pm 0,53$
Imunocomplexo Opsonizado (IgG anti-OVA+OVA+SHN)	$7,45 \pm 0,91$	$11,97 \pm 1,20$	$7,80 \pm 1,52$	$50,86 \pm 4,11$

CI_{50} : valores de concentração das substâncias que promovem 50% de inibição do burst oxidativo estão demonstrados em média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 4.17: EEBBd e seu metabólito secundário (ácido cafeico) inibem com mais eficiência o metabolismo oxidativo de neutrófilos desencadeado por estímulo independente de receptor. Análise comparativa dos valores de CI_{50} obtidos pelas porcentagens de inibição dos ensaios de quimioluminescência dependente de lucigenina (**A**) e de luminol (**B**) por três diferentes estímulos, frente ao Extrato Etanólico Bruto da *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) Maio/2007 e do ácido cafeico. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão com análise estatística de teste t (** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0014$, ns: não significativo).

4.2.5. Análise quantitativa da expressão de receptores de membrana em neutrófilos tratados com EEBBd e ácido cafeico

Durante a resposta imune inata, o reconhecimento do patógeno é primordial para ação de defesa dos neutrófilos. Os neutrófilos são capazes de reconhecer indiretamente patógenos opsonizados através dos receptores Fc γ e CR, e também diretamente através dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno. A expressão dos receptores CD32 (Fc γ RIIa), CD16 (Fc γ RIIIb), CR3 (CD11b/CD18), Toll-like 2 (TLR2) e 4 (TLR4) foi realizado afim de avaliar se alguma das substâncias estudadas poderiam interferir no reconhecimento de patógenos, bem como, no metabolismo oxidativo.

4.2.5.1. . Expressão de CD11b/CD18 (CR3)

De modo a investigar e justificar os valores de CI₅₀ mais elevados nos ensaios de QL, onde foram empregados os estímulos dependentes de receptores, inicialmente, averiguou se os níveis de expressão do CR3 estariam alterados na presença das substâncias.

Para análise da expressão do CR3 (ou CD11b/CD18), as células foram inicialmente tratadas com as substâncias e posteriormente foram estimuladas com PMA.

Os resultados mostram que os níveis de expressão de CD11b/CD18 total na presença do extrato ou do ácido cafeico apresentam os valores de MIF semelhantes aos do controle (DMSO) (**Figura 4.18 A1, B1**). Portanto, ambas as substâncias não alteraram os níveis de expressão de CD11b/CD18.

4.2.5.2. Expressão de CD32 (Fc γ RIIa) e CD16 (Fc γ RIIIb)

A ativação de neutrófilos humanos ativados por ICs envolve a participação de receptores Fc gama, sendo o reconhecimento dependente CD16 e em conjunto com o CD32, para geração de numa resposta funcional adequada no contexto do metabolismo oxidativo. (Crockett-Torabi; Fantone, 1990; Kimberly et al., 1990; Brunkhorst et al., 1992).

Os dados obtidos indicam que os tratamentos das células tanto com o EEBBd quanto com o ácido cafeico não promoveram alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis de expressão do CD32 e CD16 quando comparadas aos neutrófilos humanos tratados com DMSO (controle) (**Figura 4.18 A2,B2**).

Figura 4.18: EEBBd e o ácido cafeico não alteram os níveis de expressão dos receptores de membrana CD11b/CD18, CD32 (FcγRIIa) e CD16 (FcγRIIb) em neutrófilos humanos. Os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados com EEBBd (A) ou com ácido cafeico (B) ou DMSO (0,01%; controle) por 15 minutos. Em A1 e B1, neutrófilos foram estimulados com PMA (10^{-7} mol/L) nos 5 minutos finais. Os receptores foram marcados com anticorpos específicos e a fluorescência de 10.000 células foi avaliada por citometria de fluxo. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos independentes com medidas em duplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.2.5.3. Expressão de CD282 (TLR-2) e CD284 (TLR4)

Os ensaios descritos neste item foram realizados com o intuito de avaliar se as substâncias naturais alterariam os níveis de expressão dos receptores TLR-2 e 4 (*toll-like receptors*) na membrana dos neutrófilos, uma vez que essa alteração poderia auxiliar na compreensão do efeito inibitório do EEbBd na atividade microbicida dos PMNs frente a levedura de *C. albicans* conforme o item 4.2.6.

Conforme pode ser observado na **Figura 4.19** as células não tratadas (controle positivo) apresentam uma maior expressão TLR-2 ($88,93 \pm 6,3\%$) do que TLR-4 ($81,07 \pm 3,7\%$), em relação da porcentagem de células. Contudo, os valores de mediana de intensidade de fluorescência (MIF) foram baixos e não se divergiram entre ambos os receptores, sendo este resultado condizente com dados da literatura, na qual é descrito que neutrófilos e outros granulócitos expressam TLRs de modo moderado (Sabroe et al., 2002; Netea et al., 2008).

Por outro lado, quando as células foram tratadas com extrato da *Baccharis* (10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) não foi observado nenhuma alteração na expressão do TLR-2 ou TLR-4, não apresentando diferenças nos valores de células marcadas e de MIF para os receptores entre o extrato e o solvente (**Figura 4.19 A1, B1**).

Em contrapartida, o ácido cafeico, por sua vez, promoveu um decréscimo na expressão de TLR-2, e não de TLR-4. Embora este decréscimo sobre o TLR-2 foi significativo apenas nos percentuais de células marcadas para esse receptor, em relação ao controle positivo (DMSO: $88,93 \pm 6,3\%$), observou-se que esse efeito não foi dependente da concentração do composto, apresentando valores iguais à $79,80 \pm 5,89\%$ e $77,12 \pm 3,76\%$, respectivamente à cada concentração (**Figura 4.19 A2, B2**). Vale ressaltar, que esse decréscimo na expressão de TLR-2 não foi expressivo biologicamente, tendo apenas $12,7 \pm 2,3\%$ de redução na máxima concentração empregada do fenólico.

Figura 4.19: Ácido cafeico reduz a expressão de TLR-2 em neutrófilos humanos. Os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados com EEBBd (A1, B1) ou com ácido cafeico (A2, B2) ou DMSO (0,1%; controle). Os receptores foram marcados com anticorpos específicos e a fluorescência de 10.000 células foi avaliada por citometria de fluxo. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de seis experimentos independentes com medidas em duplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.2.6. Efeito do EEBBd e do ácido cafeico na fagocitose de zimosan por neutrófilos humanos

Durante uma inflamação, o recrutamento e ativação de neutrófilos podem ser considerados um ato de equilíbrio delicado. Uma vez atingindo o local de inflamação, essas células podem resolver as infecções por fagocitose, cujo processo é ativado de modo dependente de receptores, onde essa célula internaliza um patógeno ou partícula estranha geralmente marcada com opsoninas (Norfenfelt, Tapper 2011).

Dessa maneira, este ensaio visou determinar se o EEBBd e o ácido cafeico poderiam interferir em outra função efetora dos neutrófilos, isto é, na capacidade dessas células em reconhecer e fagocitar as partículas do estímulo (zimosan opsonizado e marcado com FITC – ZI-FITC). Assim, neste experimento empregou-se as concentrações de 10 e 50 µg/mL para EEBBd, e 36 e 90 µg/mL para o ácido cafeico.

Os dados mostram que o ácido cafeico demonstra um efeito inibitório na fagocitose de maneira dependente da concentração. No entanto, o processo de fagocitose se mantém eficiente, apresentados valores de 86,7 e 82,0%, respectivamente para cada concentração analisada (**Figura 4.20**).

Figura 4.20: EEBBd reduz fortemente a fagocitose dos PMNs, enquanto o ácido cafeico pouco altera essa função. Neutrófilos ($0,5 \times 10^6$ células/mL) suspensos em Hanks com gelatina 0,1% foram pré-incubados com citocalasina D (CD: 500 µM - controle negativo) ou com solvente (DMSO 0,2% - controle positivo) ou ácido cafeico (36 e 90 µg/mL) ou extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd, 10 e 50 µg/mL). Posteriormente, as células foram incubadas com zimosan e marcado com FITC (ZI-FITC, 100 µg/mL) e a fagocitose foi quantificada por citometria de fluxo. Os valores percentuais de fagocitose (**A**) e de inibição da função (**B**) estão expressos como média $\pm$ desvio. Porcentagens calculadas em relação com controle solvente (100% de fagocitose). Dados obtidos em quatro experimentos independentes realizados em duplicatas. *Valores estatisticamente diferentes em relação ao controle positivo através do teste Dunnett ($p < 0,05$).

Em contrapartida, nas concentrações testadas do extrato vegetal (10 e 50µg/mL) demonstraram interferência na capacidade de fagocitar as partículas de ZI-FITC, reduzindo essa função efetora dos neutrófilos a valores de 71,3 e 52,4%, respectivamente a cada concentração, nos remetendo a taxas de inibição iguais à 28,7 e 47,63 % (**Figura 4.19**).

4.2.7. Efeito do EEBBd e do ácido cafeico sobre a atividade microbica dos PMNs

Após verificar que a interferência das amostras na capacidade dos neutrófilos em fagocitar partículas opsonizadas (zimosan opsonizado - Ziops), investigou se estas também interferiram na capacidade microbica dos neutrófilos sobre a *Candida albicans*.

Estudos prévios realizados no laboratório, verificou que o extrato etanólico bruto de *Baccharis dracunculifolia* reduziu a capacidade dos neutrófilos humanos em destruir a *Candida albicans*, apenas na concentração máxima empregada (50µg/mL) (**Figura 4.21 A2**). Além disso, até a concentração máxima do mesmo extrato e na ausência de células, não houve efeito direto sobre as leveduras deste fungo (**Figura 4.21 A2**).

Contrapondo com este resultado, o ácido cafeico não interferiu na habilidade dessas células no *killing*, detendo valores percentuais de morte das leveduras semelhantes aos controles do ensaio (**Figura 4.21 A2**). Do mesmo modo, na ausência de neutrófilos, o fenólico também não possui efeito direto sobre a *C. albicans*, não observando diferenças nos valores de absorvância aos controles positivo (HBBS) e solvente (DMSO) (**Figura 4.21 B2**).

Portanto, o ácido cafeico por si só não apresenta atividade fungicida nas concentrações testadas, e tampouco inibe a capacidade microbica do neutrófilo frente ao fungo, indicando que o fenólico não é o metabólito secundário da *Baccharis* responsável pelo efeito observado nesta atividade celular com o extrato dessa espécie vegetal.

A1

B1

A2

B2

Figura 4.21: Apenas o EEBBd promove decréscimo na função de *killing* em neutrófilos humanos. **A:** Avaliação da viabilidade de $0,6 \times 10^6$ ufc/mL de *Candida albicans* (ATCC 64548), analisada através do ensaio de redução do MTT, após incubação com diferentes amostras na presença e na ausência de neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL). A viabilidade do fungo é considerada proporcional à leitura da absorvância em 545 nm. **B:** Porcentagem de morte de $0,6 \times 10^6$ ufc/mL de *Candida albicans* (ATCC 64548) após incubação com neutrófilos humanos previamente incubados com diferentes amostras. A porcentagem de morte da levedura foi calculada em relação ao controle positivo (100% de viabilidade). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de cinco experimentos realizados em duplicata. *amostras estatisticamente diferentes em relação aos controles HBBS e DMSO 0,1% com análise ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison ($p < 0,05$). Os dados expressos nos gráficos A2 e B2 foram obtidos por Figueiredo-Rinhel (dados ainda não publicados).

5. DISCUSSÃO

Em 2013, Figueiredo-Rinhel e colaboradores, observaram que extratos etanólicos bruto de folhas da *Baccharis dracunculifolia*, coletadas num período de 12 meses (Agosto/2006 à Julho/2007), apresentavam perfis distintos inibitórios sobre a atividade biológica que envolvem a geração de ânion superóxido e ERO totais por neutrófilos humanos estimulados com zimosan opsonizado (ZIops) e medidos por ensaios de quimioluminescência dependente de lucigenina e luminol. Dentre essas 12 amostras de extrato, a do mês Maio/2007 foi a que deteve a maior habilidade inibitória nos ensaios de QLluc e QLlum. Este efeito biológico demonstra uma correlação positiva com as altas concentrações de ácido cafeico neste extrato de Maio/2007, cujo pico de produção deste composto está situado nos meses de Maio-Junho/2007. Além disso, aquele mesmo efeito observado também é justificado pelo fato do extrato de Maio/2007 deter maiores taxas proporcionais de ácido cafeico em relação a compostos fenólicos totais; ou a flavonoides totais ou a compostos isolados da planta (ácido *p*-cumárico, aromadendrina-4'-metil éter (AME), isosakuranetina, Artepillin C).

Diante desses resultados, os autores concluíram que a (i) sazonalidade influencia na quantidade dos constituintes da planta, bem como afeta nas atividades biológicas desempenhadas pelos extratos obtidos em meses do ano. Além disso, o fato do extrato Maio/2007 demonstrar maior atividade antioxidante e por deter uma elevada taxa proporcional de ácido cafeico em relação a de outros compostos isolados, (ii) acredita-se que essa taxa possa ser empregado com um marcador químico da atividade inibitória da *Baccharis* sobre metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Para continuar a investigação do potencial imunomodulatório do extrato etanólico bruto da *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd Maio/2007) e do ácido cafeico, este trabalho propôs avaliar como esses produtos naturais influenciam sobre funções efetoras dos neutrófilos e dar o início no entendimento dos seus mecanismos de ação. Para tanto, o trabalho analisou (a) a citotoxicidade destas substâncias sobre os neutrófilos humanos; (b) a influência sobre funções efetoras dos PMNs, como fagocitose e *killing* de patógenos; (c) habilidade *scavenger* do radical livre do DPPH e das espécies reativas HOCl e H₂O; (d) o papel do composto fenólico na inibição da atividade da mieloperoxidase isolada de PMNs, (e) a modulação do burst oxidativo desencadeado por estímulo independente e dependente de receptores Fcγ e/ou CR (receptor de complemento); (f) e a influência no nível de expressão de receptores de membrana: CD16, CD32, CD11b/CD18, TLR-2 e TLR-4.

Primeiramente, para verificar se o efeito inibitório, observado pelo extrato e o ácido cafeico sobre o metabolismo oxidativo, somente envolve uma atividade *scavenger* das espécies reativas de oxigênio e/ou inibição de enzimas-chaves na produção dessas, empregou-se metodologias *in vitro* livres de células e *in silico*.

Neste trabalho, quatro fenilpropanóides (ácido *t*-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico) foram avaliados *in vitro* a habilidade de sequestrar o radical livre da estrutura estável do DPPH. Os resultados apontaram que o ácido cafeico e o ácido ferúlico detiveram uma expressiva capacidade de reduzir o DPPH, podendo observar este efeito mais acentuado pelo ácido cafeico (**Figura 4.1**), corroborando com dados descritos na literatura (Karamac et al., 2005; Khanduja et al., 2006; Wu et al., 2007). Esses dados nos indicam que o número de hidroxilas livres e suas posições em *meta* (*m*-) e *para* (*p*-) no grupo catecol são essenciais na eficácia destas moléculas frente ao sequestro (ou efeito *scavenger*) de radicais livres (Franck et al., 2013), o que justifica o ácido cafeico apresentar maior atividade, por deter uma hidroxila a mais no anel aromático, quando comparada a estrutura do ácido ferúlico e dos demais compostos analisados.

Diante deste resultado, diferentes concentrações do ácido cafeico foram empregadas o que permitiu o cálculo do CI_{50}^{DPPH} , sendo igual a $5,87 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ e tendo uma redução do radical livre do DPPH de 78% na máxima concentração utilizada ($14,4 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 4.2 e Tabela 4.1**). Este resultado concorda com aquele ao obtido por Gülçin (2006). Além disso, o composto fenilpropanóide demonstrou uma atividade *scavenger* cerca de oito vezes maior do aquela do extrato EEBBd, que apresentou um valor de CI_{50}^{DPPH} igual a $49,16 \pm 1,84 \mu\text{g/mL}$ (Figueiredo., 2010), indicando que o ácido cafeico seja um bom marcador *scavenger* do extrato.

Em continuidade a essa atividade e para relacionar o papel *scavenger* das amostras (EEBBd e ácido cafeico), no contexto do burst oxidativo promovido pelas células, verificou-se as mesmas são capazes de sequestrar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; substrato de mieloperoxidase - MPO) e também o ácido hipocloroso (HOCl, um dos produtos formados pela MPO).

Os dados obtidos apontam que, novamente o ácido cafeico deteve um maior efeito *scavenger* do HOCl (CI_{50}^{HOCl} : $1,5 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$), sendo 2,5 vezes maior aquele obtido com o EEBBd (CI_{50}^{HOCl} : $4,0 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 4.3 e Tabela 4.2**). Do mesmo modo, o fenólico foi mais eficaz em sequestrar H_2O_2 , sendo 18 vezes maior nessa habilidade *scavenger* ($CI_{50}^{H_2O_2}$: $0,072 \pm 0,008 \mu\text{g/mL}$) que a do EEBBd ($CI_{50}^{H_2O_2}$: $1,30 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 4.4**

e **Tabela 4.3**). Esta capacidade de sequestrar o substrato da MPO, também foi observado por nos trabalhos da literatura Sroka & Cisowski (2003) e Nakajima et al. (2009), cujo último trabalho empregou-se um sistema com células e sonda fluorescente, onde o ácido cafeico deteve uma atividade *scavenger* de H_2O_2 , resultando numa faixa de $\text{CI}_{50}^{\text{H}_2\text{O}_2}$ igual à 0.22 - 0.36 μM , cujo valor é bem próximo ao obtido neste trabalho $\text{CI}_{50}^{\text{H}_2\text{O}_2}$ $0.4 \pm 0.05 \mu\text{M}$ (**Tabela 4.3**).

Vale ressaltar que Gülçin (2006) demonstrou em um sistema livre de células, que o ácido cafeico (10 $\mu\text{g/mL}$) também possui 61,9% de atividade *scavenger* do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), cuja espécie reativa é produto gerado pelo complexo enzimático NADPH oxidase em neutrófilos ativados e, está relacionado em vários processos patofisiológicos, devido à sua transformação em mais espécies reativas, tais como, radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$), que são responsáveis em iniciarem a peroxidação lipídica (Wickens, 2001) acarretando em danos teciduais.

Além disso, trabalhos recentes também demonstraram que o grupo fenólico, presente no ácido cafeico, possui *in vitro* um efeito quelante (ou *quenching*) do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Asano, Iwahashi, 2014), sendo este efeito mais acentuado quando o composto é dissolvido em condição básica (pH 10–12), devido a formação do ânion fenolato (na estrutura do composto), que favorece a transferência de elétrons para o oxigênio singlete (Ohara et al., 2012). Portanto, o conjunto destes resultados e com os dados já descritos na literatura, nos confirmam que o ácido cafeico é ótimo marcador químico do EEBBd na atividade *scavenger* de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, as quais estão envolvidas no contexto do metabolismo oxidativo de neutrófilos.

Uma vez demonstrou-se a habilidade antioxidante do ácido cafeico tanto sobre o substrato (H_2O_2) quanto sobre o produto (HOCl) da enzima MPO, passou-se investigar se o fenólico interferiria na atividade enzimática da mesma.

Como os produtos oxidantes derivados da MPO contribuem para o dano tecidual, na iniciação e propagação de doenças inflamatórias crônicas e agudas, que envolvem a participação dos neutrófilos, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas destinadas a inibição eficiente da MPO deve-se considerar em diferentes níveis: (a) bloqueio do sítio ativo da enzima; (b) alteração do ciclo de geração de compostos clorados; (c) inibição irreversível pelo uso de inibidores oxidados e (d) aplicação de captadores/sequestradores de HOCl para prevenção da iniciação e propagação das respostas inflamatórias (Malle et al., 2007).

Nesse contexto, a administração de substâncias fenólicas, conhecidas como captadoras de radicais livres têm sido adotada como uma das estratégias terapêuticas na modulação de doenças inflamatórias (Middleton Junior; Kandaswami, Theoharides, 2000; Kabeya, 2006).

Diante do conjunto dessas informações e dos resultados até o momento discutidos, o composto fenólico (ácido cafeico) também exibiu um potencial inibitório da atividade enzimática da mieloperoxidase (**Figura 4.5**), o que concordou com os resultados descritos por Kato et al. (2003), Mehrotra et al. (2011) e Franck et al. (2013). Além disso o ácido cafeico exibiu um valor de $CI_{50}^{QL\ MPO}$ igual a $0,056 \pm 0,003\ \mu\text{g/mL}$, apontando um efeito inibitório de 5,6 vezes maior ao obtido pelo EEBBd ($0,316 \pm 0,054\ \mu\text{g/mL}$).

É importante ressaltar, que os trabalhos da literatura citados, bem como este trabalho, utilizam em seus ensaios *in vitro* o peróxido de hidrogênio e/ou íon cloreto (em soluções tampões), o que não nos permite concluir se há realmente uma inibição enzimática ou se o efeito é devido da habilidade do composto em captar o peróxido de hidrogênio e/ou o ácido hipocloroso. A dificuldade em esclarecer este mecanismo, é que até o momento que não há relato na literatura demonstrando como ocorrer a inibição da mieloperoxidase pelo composto fenólico aqui estudado.

Diante dessa consideração, com o intuito de compreender o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação, principalmente, do ácido cafeico no efeito inibitório nos ensaios *in vitro*, anteriormente discutidos, e sabendo-se que não há dados de modelagem molecular na literatura científica para elucidar este aspecto, utilizou-se neste trabalho a análise computacional por docking, visando elencar os tipos e locais de interações que o fenólico possa estabelecer com enzima.

Os resultados obtidos, nessa análise *in silico*, revelaram que o ácido cafeico demonstrou potenciais modos de interações com o sítio ativo da MPO, sendo estes através de: (i) ligações de hidrogênio com His-95 e Arg-239; (ii) ligações de hidrogênio simultâneas com Gln-91, His-95 e Arg-239 e (iii) interação direta da porção carboxílica com o ferro do grupo heme. (**Figuras 4.7 A-E**). Essas ligações de hidrogênio foram estabelecidas pelas hidroxilas do anel aromático e acontecem profundamente no sítio catalítico da MPO, de modo a obstruir a entrada deste local. Observou-se também o empilhamento do anel da substância fenólica com um dos anéis do grupo heme da enzima. Além disso, foi visto outro modo de interação, a qual é descrita como lateral e situada mais para fora do sítio ativo, tendo como resíduos alvos dessa interação as Arg-333 e Arg-424. É importante ressaltar, que nesse último modo de

interação também revelou a obstrução da entrada do sítio ativo da enzima (**Figuras 4.7 F,G,J**).

Nessa perspectiva, presume-se que a inibição da enzima mieloperoxidase pela substância fenólica, observada no ensaio *in vitro*, possa estar ocorrendo pelos seguintes motivos:

i. Na obstrução do sítio ativo através interação com os resíduos de aminoácidos His-95 e Arg-239, essenciais na clivagem do H_2O_2 e na geração do intermediário instável (composto I), respectivamente, o qual é um dos responsáveis pela oxidação do luminol no sistema MPO- H_2O_2 -luminol. Assim, presume-se que houve a redução na formação do composto I que, por consequência, decresce a oxidação do luminol e, por sua vez, diminuiu a emissão de fótons oriundos do produto formado dessa oxidação (veja a **Figura 3.6**).

ii. E na habilidade do ácido cafeico em sequestrar o substrato (H_2O_2) da enzima, cujo efeito também pode estar contribuindo na redução na formação do composto I, somando ao efeito redutor de fótons emitidos, conforme anteriormente descrito.

Além disso, este presente trabalho propôs investigar se a inibição da MPO pelo EEBBd Maio/07, observado no ensaio *in vitro*, haveria alguma relação direta com o ácido cafeico ou com outros compostos derivados do ácido cinâmico, como: *trans*-cinâmico, *para*-cumárico e ferúlico.

Os resultados da análise *in silico*, por docking, revelaram que os todos os ácidos investigados demonstraram os mesmos modos de interação, observados com o ácido cafeico, isto é, os modos de interações que envolvem: **(a)** a porção carboxílica interagir diretamente com átomo de ferro do heme, **(b)** o empilhamento dos anéis e **(c)** a interação lateral com os resíduos Arg-333 e Arg-424, situados mais distante do sítio ativo (dados não mostrados). Entretanto, pelo fato destas substâncias diferirem apenas pelo número ou substituição de hidroxilas no anel aromático, as diferenças nos modos de interação entre os ácidos são aquelas que envolvem as ligações de hidrogênio estabelecidas entre os resíduos do sítio ativo da enzima: Gln-91, His-95 e Arg-239.

Nessa perspectiva, considerando todos os resultados obtidos, e adotando como quesito de análise a somatória do número de ligações de hidrogênio distintas entre si, que foram estabelecidas pelas hidroxilas e os resíduos do sítio ativo, presume-se que a ordem de afinidade das substâncias testadas com a MPO na análise *in silico* seja: ácido cafeico >

ferúlico = *para*-cumárico > *trans*-cinâmico. Isto por que esses ácidos foram capazes de estabelecer, respectivamente, 5, 3, 3 e 0 ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio.

Os dados experimentais *in silico* até aqui discutidos sugerem, que o efeito inibitório *in vitro* da enzima MPO pelo extrato vegetal (EEBBd) pode ser atribuído pela atuação do ácido cafeico sobre a enzima, cujo composto foi capaz de bloquear o sítio ativo da enzima estabelecendo várias ligações de hidrogênios com os resíduos de aminoácidos deste local. Da mesma maneira, acredita-se também que os demais compostos fenólicos (principalmente, ferúlico e cumárico) também detenham uma parcela de contribuição na inibição da enzima pelo extrato, pois apresentaram os mesmos modos de interações do ácido cafeico com enzima, divergindo entre si no número e na simultaneidade de ligações de hidrogênio estabelecida com o sítio ativo em único modo de interação. Além do mais, presume-se que o ácido cafeico consiga se manter dentro do sítio ativo por mais tempo que os demais ácidos, devido ao maior número de ligações de hidrogênio estabelecido por este composto. Porém, para validação desta última hipótese é necessário dados de dinâmica molecular *in silico*.

Ampliando o horizonte desta discussão e seguindo a lógica observada, uma substância que teria potencial em deter uma maior afinidade pela enzima, do que o ácido cafeico, seria um derivado do ácido cinâmico contendo 03 hidroxilas no anel aromático, pois as ligações de hidrogênio com os resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239 seriam estabelecidas de forma simultâneas num único modo de interação. Essa situação foi observada durante a validação do método, quando se empregou o ácido gálico (**Figura 4.28 C-E, Apêndice 1**). Entretanto, este composto trata-se de um derivado de ácido benzoico e não de um ácido cinâmico.

Além disso, por mais que o inibidor empregado no ensaio *in vitro* o ABAH (o hidrazida do ácido 4-aminobenzoico) estabeleça apenas uma ligação de hidrogênio a menos que o ácido cafeico, acredita-se que a afinidade daquele inibidor seja maior do que a de todos os ácidos, devido a semelhança com o inibidor SHA (empregado na validação do docking), o que é suportado pelo valor de energia de interação predita pelo docking: -7.9 kcal/mol para ABAH; -8.2 kcal/mol para SHA e cerca de -6.5 kcal/mol para todos os modos de interação dos ácidos investigados.

Vale ressaltar que uma limitação deste método de análise *in silico*, se deve ao fato de que não foram encontradas na literatura moléculas para serem utilizadas como controle negativo. Dessa forma, na ausência deste controle não é possível estabelecer um limite mínimo de interações moleculares abaixo da qual não seria experimentalmente observada na

complexação entre o ligante e a enzima MPO. Entretanto, essa limitação não anula os resultados alcançados na etapa de validação do método empregado neste trabalho.

Em suma, o conjunto dos resultados obtidos na análise *in vitro* e *in silico* concordam com trabalhos da literatura, demonstrando que moléculas de baixo peso molecular podem interagir com o sítio ativo da MPO (Shiba et al., 2008, Franck et al., 2013) e que, a presença de grupos hidroxila no anel aromático é uma característica estrutural importante para a inibição da atividade de peroxidases (Kabeya et al., 2007).

Finalizados os ensaios *in vitro* na ausência de células, passou-se investigar se as amostras poderiam prolongar o efeito antioxidante em nível celular, utilizando como modelo os neutrófilos humanos (ou PMNs) isolados do sangue periférico.

Inicialmente, antes de avaliar o efeito do extrato da *Baccharis* e do seu metabólito secundário (ácido cafeico) sobre as funções efectoras dos neutrófilos, foi necessário verificar se as amostras aqui estudadas exerciam efeitos citotóxicos sobre as células em questão, uma vez que a redução da viabilidade celular comprometeria a interpretação dos resultados dos ensaios funcionais. Os ensaios de toxicidade celular apontaram que o EEBBd demonstrou um certo grau citotóxico sobre as células, quando se empregou altas concentrações do extrato (100 à 200 µg/mL), visto que observou-se diferenças estatisticamente significativas na viabilidade e na quantidade de LDH liberada nessas células, tratadas com o extrato, quando comparadas aos controles. Contudo é importante ressaltar, que essa amostra não demonstrou ser extremamente tóxica, pois a mesma não foi capaz de reduzir drasticamente os percentuais de viabilidade celular (cerca de 87%) e não promoveu uma alta taxa de liberação da LDH, a qual não excedeu valores de 20%. Em suma, neste trabalho delimitou-se o valor de 50 µg/mL como concentração máxima do extrato a ser utilizada nos próximos ensaios, uma vez que nessa concentração não se observou alterações na viabilidade dos PMNs, concordando com os dados obtidos por Figueiredo (2010). (**Tabela 4.4**)

Por outro lado, em todas as concentrações do ácido cafeico (27 até 90 µg/mL) empregadas nesse mesmo ensaio, não se observou nenhum efeito tóxico sobre as mesmas células, pois os valores dos parâmetros de viabilidade listados não se diferenciaram entre as concentrações do fenólico e aos controles do ensaio. Do mesmo modo, a concentração máxima do ácido cafeico para os posteriores ensaios foi delimitada em 90 µg/mL ($\approx$ 500 µM). (**Tabela 4.5**)

Portanto, o conjunto desses últimos resultados nos permite afirmar com segurança, que o efeito modulatório das substâncias sobre as funções efetoras de neutrófilos humanos não é mediada pela toxicidade direta das amostras sobre as células.

Mediante as respostas imunes aos antígenos estranhos, infecções e lesões teciduais observa-se que uma produção constante, em nosso organismo, de complexos imunes de antígenos-anticorpos (ICs). Esses complexos imunes (ICs) são transportados, através da ligação com os eritrócitos para o fígado e baço, onde serão eliminados na circulação. Entretanto, a formação não controlada de ICs e os defeitos nos mecanismos de clearance dos ICs, resultam na deposição desses mesmos em vasos e tecidos, que ativarão o sistema complemento e promoverá o recrutamento de células inflamatórias (Jancar, Crespo, 2005; Mayadas, Tsokos, Tsuboi, 2009). Dentre essas células inflamatórias está incluso os neutrófilos, os quais no sítio de inflamação podem ser ativados mediante os receptores FcγR e do complemento (CR), desencadeando algumas suas funções efetoras como: a fagocitose, desgranulação e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são produzidas principalmente pela ação das enzimas NADPHoxidase e da mieloperoxidase (MPO).

Embora os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro, essas células também detém uma parcela de participação nas respostas inflamatórias crônicas. Nesse sentido, diversos trabalhos do nosso e de outros laboratórios têm investigado a habilidade de produtos naturais (extrato de plantas, própolis) e de compostos sintéticos sobre a modulação/inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos, desencadeado por ICs e outros estímulos (Krol et al., 1996; Simões et al., 2004; Andrade et al., 2013; Franck et al., 2013; Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Kabeya et al., 2013a,b; Santos et al., 2014). Essa investigação só tem sentido se as amostras analisadas não absorverem a luz na mesma faixa de comprimento de onda de emissão das sondas quimioluminescentes. Esta análise foi feita, e os resultados apresentados na Figura 4.12 demonstram que o EEBBd e o ácido não exercem efeito sobre as sondas.

Dando continuidade a esses estudos, realizou-se uma investigação para avaliar se haveria diferenças na quantidade de ERO produzidas pelas células ativadas por estímulos solúvel (PMA) e insolúvel (ICs), empregadas nos ensaios de metabolismo oxidativo. Os dados apontaram que o PMA foi o estímulo que mais induziu a produção, tanto de ERO totais, quanto do ânion superóxido, seguindo pelo o imunocomplexo opsonizado (IC-SHN) e por fim, pelo imunocomplexo não-opsonizado (IC). (**Figura 4.13 A, B**).

Posteriormente a essa análise, também se realizou uma investigação preliminar no metabolismo oxidativo, na qual averigou se haveria diferenças na quantidade de ERO produzidas pelas células ativadas por estímulo solúvel (PMA, independente de receptor) e insolúvel (ICs, dependente de receptor). Assim, os dados apontaram que o PMA foi estímulo que mais induziu a produção tanto de ERO totais quanto do ânion superóxido. Na mesma análise sobre ambas as produções, o imunocomplexo opsonizado (IC-SHN) foi o estímulo subsequente ao PM, seguido por final, pelo imunocomplexo não-opsonizado (IC). (**Figura 4.13 A, B**).

Após análise criteriosa das possíveis interferências (efeito citotóxico e quenching), bem como compreender os perfis de produção de ERO nos ensaios de QL, investigou se haveria uma correlação positiva entre a concentração das substâncias naturais aqui estudadas e a quantidade de ERO produzidas pelos diferentes estímulos.

Primeiramente, avaliou-se o *burst* respiratório das células mediado por um estímulo independente de receptor (PMA). Os dados obtidos apontaram que o fenólico deteve a habilidade dependente de concentração em modular aquela função biológica das células mensurada nos ensaios de QL com as sondas luminol e lucigenina (**Figura 4.14 C,D**). Este efeito dependente de concentração, observado pelo ácido cafeico demonstra ser condizente aos dos estudos de Krol et al., 1996 e Franck et al., 2013.

Além disso, verificou-se que o ácido cafeico foi mais efetivo do que o EEbBd na habilidade de capturar e eliminar tanto, o ânion superóxido quanto as ERO totais, resultantes da estimulação com PMA (ver os valores de CI_{50} com PMA; **Figura 4.17 e tabela 4.6**). A explicação para estes efeitos podem ser baseada nos seguintes relatos da literatura:

i. Já é descrito que a composição química das espécies do gênero *Baccharis* é caracterizada pela presença de triterpenos, diterpenos, e de substâncias fenólicas, como flavonoides e derivados do ácido cinâmico (Bohlmann et al., 1981; Sforcin et al., 2012). Estes diversos compostos possivelmente podem estar interagindo entre si e atuando de forma sinérgica ou antagônica, potencializando ou reduzindo a atividade antioxidante de um determinado composto. Além disso, embora os compostos fenólicos sejam conhecidos pela acentuada atividade antioxidante, tais moléculas podem ser convertidas em agentes pro-oxidantes em determinadas condições como: a concentração do composto, solubilidade, pH do meio e potencial de redução de metais (Fukumoto, Mazza, 2000; Sakihama, et al., 2002). Desse modo, a habilidade do EEbBd em sequestrar as espécies reativas no meio reacional

envolve uma somatória de efeitos anti e pró-oxidante das inúmeras substâncias que o compõem.

Assim, o efeito sobressalente do composto fenólico, na sua forma isolada, deve-se a sua potente habilidade *in vitro* de sequestrar as principais espécies reativas produzidas pelos PMNs, como: HOCl e H₂O₂ (**Figuras 4.3 e 4.4**) e O₂^{•-} (conforme relatado por Gülçin, 2006).

ii. A ativação de neutrófilos com PMA é capaz de induzir nessas células uma exaustiva desgranulação dos grânulos gelatinase, seguida por uma moderada liberação de grânulos específicos e por fim, baixas taxas de exocitose de grânulos azurofílicos, cujo marcador deste último subconjunto de grânulos é a mieloperoxidase (Faurschou et al., 2002; Kjeldsen et al., 1992). Diante dessa consideração, o conjunto de alguns fatores como: a baixa taxa de liberação de mieloperoxidase induzida pelo PMA, a ação inibitória da enzima e atividade scavenger das espécies reativas (H₂O₂, HOCl, O₂^{•-}) pode explicar, pelo menos em parte, a redução promovida pelo ácido cafeico na QLlum desencadeada pelo PMA.

iii. A estimulação de neutrófilos com PMA – um mimético estrutural do diacilglicerol (DAG) – promove ativação da fosfolipase D (Hu et al., 2011) e de isoformas das proteínas kinases C (PKC – Blumberg, 1988; Way et al., 2000), sendo que, uma vez ativada essa última enzima é capaz de induzir uma cascata de sinalização de MAPkinase (Seger, Krebs, 1995), culminando em algumas funções biológicas dos PMNs como: a ativação da NADPHoxidase e a formação de NETs (Dekker et al., 2000; Fuchs, 2007; Brinkmann, 2004; Hakkim et al., 2011; Branzk et al., 2014). Além disso, devido à sua natureza parcialmente lipofílica, presume-se que os ácidos fenólicos atravessam a membrana da célula por difusão passiva na sua forma não dissociada, perturbando a estrutura da membrana celular e, possivelmente, acidificando o citoplasma e fazendo com que haja a desnaturação de proteínas (Campos et al., 2009; Ota et al., 2011; Žilius et al., 2013).

Tendo como verdade o conjunto dessas informações, acredita-se que a acentuada inibição das ERO totais pelo ácido cafeico nos ensaios de QLlum com PMA (CI₅₀ = 0,258 ± 0,09 µg/mL) possa estar relacionada pelo conjunto de efeitos inibitórios do fenólico com as enzimas MPO (**Figuras 4.5 e 4.7**) e a PKC, cuja última enzima o ácido cafeico também é capaz de inibir sua atividade (CI₅₀^{PKC}: 95µM ou ≈17,1µg/mL), conforme os ensaios descritos por Nardini e colaboradores (2000). Por consequência, a inibição da PKC pelo fenólico pode interferir nos sinais posteriores à PKC, como o decréscimo na fosforilação e translocação da p47^{phox}, uma importante subunidade da NADPHoxidase. Desse modo, é presumível apontar um efeito indireto do ácido cafeico na organização dos componentes proteicos do complexo

NADPHoxidase, o que afetaria a sua formação. Também já se conhece que essa substância fenólica pouco inibe (27.4%) a atividade deste complexo enzimático (Hyogo et al., 2010).

Os resultados da avaliação do *burst* respiratório dos PMNs por estímulos dependentes de receptores (ICs) e expressos em valores de CI_{50} da quimioluminescência, mostraram que o efeito inibitório de ambas as amostras nesta atividade biológica foi mais acentuado sobre os neutrófilos estimulados via $Fc\gamma R$ (CD32/CD16) quando comparados as células estimuladas via $Fc\gamma R$ + CR3 (**Figura 4.17 e Tabela 4.6**).

O aumento da concentração das amostras e dos valores de CI_{50} , sobre a função biológica ativada pelo IC-SHN é justificável pelo fato de que a ativação conjunta $Fc\gamma R$ + CR3 foi capaz de promover um aumento significativo na produção de ERO do que somente a ativação por $Fc\gamma R$ (**Figura 4.13**). Essa diferença de produção já era esperada, pois a mesma está relacionada com a cooperação entre os receptores CD16 e CD32, que aumenta a capacidade dos neutrófilos em produzir ERO e é reduzida drasticamente quando o receptor CD16 é inibido (Crockett-Torabi; Fantone, 1990). Além do mais, o receptor de complemento (CR3) também atua conjuntamente com o receptor CD16 no reconhecimento e fagocitose de imunocomplexos (ICs), bem como na ativação da produção de ERO (Zhou et al., 1992; Krauss et al., 1994; Vossebeld et al., 1997).

Em última análise comparativa, verificou-se que as duas substâncias estudadas detiveram uma maior eficiência em modular o metabolismo oxidativo dos PMNs desencadeado por um agente solúvel (PMA), quando comparado a mesma habilidade frente aos estímulos dependente de receptor(es) (IC:IgG-OVA/ IC:IgG-OVA-SHN). Assim, concluiu-se que não houve uma relação entre a concentração das amostras e na redução de ERO no meio, gerados pelos diferentes estímulos (**Figuras 4.13 e 4.17, Tabela 4.6**).

Além do mais, sabe-se que apenas a ativação dos receptores $Fc\gamma R$ e CD11b/CD18 desencadeia tanto o metabolismo oxidativo quanto a fagocitose em neutrófilos, enquanto o estímulo solúvel PMA desencadeia a produção de ERO, mas não a fagocitose. Dessa maneira, acredita-se que o baixo efeito inibitório sobre o metabolismo oxidativo promovido pelos estímulos dependentes de receptores, deve-se ao fato de que uma considerável parcela do ácido cafeico esteja concentrado dentro das vesículas fagocíticas, cujo pH alcalino inicial da formação do fagossomo e a mudança para o pH neutro por vários períodos de tempo na fases tardias do fagossomo (Segal et al., 1981; Jankowski et al., 2002), possa estar limitando a ação antioxidante do fenólico, de modo que o pH fagossômico deva estar alterando a estrutura química do composto, presumindo-se intervenções na interação do ácido cafeico com a MPO

e, na redução do seu potencial *scavenger* dependente do pH do meio, já elucidado nos estudos de Amorati et al. (2006), Asano & Iwahashi (2014) e Ohara et al. (2012). Nestes trabalhos, os autores descrevem que a atividade antioxidante de compostos fenólicos é substancialmente aumentada em um meio alcalino.

Diante desse conjunto de resultados, para investigar e justificar os valores de CI_{50} mais elevados nos ensaios de QL, onde foram empregados os estímulos dependentes de receptores (IC e IC-SHN), analisou se as amostras estariam regulando o nível de expressão dos receptores CD16, CD32 e CD11b/CD18, cuja regulação por sua vez estariam modulando a produção de ERO nas células. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que ambas as amostras não alteraram os níveis de expressão dos receptores de membrana em questão (**Figura 4.18**).

Portanto, diante destas informações e dos resultados obtidos, o ácido cafeico parece ser um bom marcador químico do EEBBd no contexto inibitório do metabolismo oxidativo de neutrófilos, sendo mais pronunciado a inibição desse fenólico quando essa função biológica é desencadeada por um estímulo solúvel.

Além disso, diante das moléculas sinalizadoras ativadas em cada estímulo, nota-se que a enzima PKC é a molécula em comum entre as vias de sinalização engatilhada pelos estímulos empregados neste trabalho. É dessa maneira, o efeito inibitório mais efetivo com o PMA permite pressupor que o composto fenólico parece não interferir de forma expressiva nas moléculas que antecedem a ativação da PKC, como Src, Syk, PLC e PI3K. Todavia, para confirmação dessa hipótese, ensaios adicionais são necessários para investigar se as substâncias aqui estudadas possuem inibição sobre as moléculas intracelulares envolvidas, nas distintas vias sinalização dos estímulos avaliados.

Dentre as funções do neutrófilo na defesa do hospedeiro contra patógenos estão incluídas os seguintes processos: a migração para os tecidos, reconhecimento do patógeno, fagocitose, produção de ERO e desgranulação (Mócsai, 2013). Uma vez promovida a migração dos neutrófilos do sangue para o sítio inflamatório, mediante à um gradiente de fatores quimiotáticos, esses leucócitos polimorfonucleares reconhecem e fagocitam o antígeno, seja ele de natureza infecciosa ou não. Desse modo, a habilidade dos neutrófilos de fagocitar partículas da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* opsonizadas com soro humano normal (ZimosanOps), na presença das substâncias estudadas, foi avaliada *in vitro* por análise de citometria de fluxo. Os dados obtidos nessa etapa experimental mostraram

que o extrato vegetal promoveu uma inibição na capacidade fagocítica dos neutrófilos (28 à 48%) mais acentuada pela aquela promovida pelo ácido cafeico (13 à 18%), sendo ambas dependentes da concentração (**Figura 4.20**). Vale ressaltar que a função fagocítica na presença do composto fenólico foi preservada cerca de 82%.

Em conformidade aos resultados dos ensaios de fagocitose, observou-se que nas condições experimentais empregadas neste trabalho a aplicação de diferentes concentrações do ácido cafeico, diferentemente do EEBBd (em 50 µg/ml), não reduziu a habilidade microbida dos PMNs frente à levedura *Candida albicans* não opsonizada (**Figura 4.21 – B1,B2**). Além disso, esses resultados não sofreram interferência de efeito tóxico direto das amostras sobre o fungo (**Figura 4.21 – A1,A2**). O efeito não fungicida do ácido cafeico já foi demonstrado por De Vita et al. (2014), onde observou que o ácido cafeico não altera no crescimento das células de *C. albicans*.

Na busca de compreender a interferência observada do EEBBd sobre a habilidade microbida dos PMNs, investigou se o extrato e seu metabólito secundário estariam alterando a expressão de TLR-2 e TLR-4, cujos receptores compreendem no grupo de receptores de reconhecimento padrão de fungos (Naglik, 2014; Netea et al., 2008) e, que são expressos nos neutrófilos humanos em quantidades baixas à moderadas, quando comparadas as monócitos/macrófagos (Sabroe et al., 2002; Hayashi, Means & Luster, 2003; Netea et al., 2008). De modo surpreendente e contrariando as expectativas, o extrato vegetal demonstrou não alterar a expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4, tanto nos valores de MIF quanto nos percentuais de células marcadas. (**Figura 4.19 - A1, B1**). Por outro lado, o ácido cafeico foi capaz de reduzir apenas o nível de expressão de TLR-2, e não de TLR-4, sendo este efeito observado somente nos percentuais de células marcadas (**Figura 4.19 - A2, B2**). Vale ressaltar que o decréscimo na expressão de TLR-2 não foi expressivo biologicamente.

De maneira interessante e contrariando os resultados deste trabalho, dois estudos recentes demonstraram que a própolis e um dos seus constituintes, o ácido cafeico, elevaram a atividade fungida de monócitos humanos frente a *Candida albicans*. O conjunto dos dados desses dois trabalhos demonstra que a ação imunomodulatória observada por esses produtos naturais, deva ter o envolvimento do TLR-2 e TLR-4 no mecanismo daquela ação. Isto por que, embora as substâncias (própolis e o fenólico) apresentaram distintos perfis na modulação da expressão daqueles receptores, isto é, a primeira substância elevou o TLR-4 enquanto a segunda diminuiu o TLR-2, os monócitos tratados com as amostras e com o bloqueio de TLR-2 ou TLR-4, observou-se o decréscimo na habilidade microbida e na produção de citocinas

(IL-10 e TNF- α), respectivamente aos bloqueamento dos receptores. Dando indício que o ácido cafeico deva estar parcialmente envolvido na ação imunomoduladora da própolis sobre os monócitos (Búfalo et al., 2014; Búfalo, Sforcin, 2015).

Além disso, o receptor de complemento do tipo 3 (CR3; CD11b/CD18) também caracterizado como um receptor de reconhecimento de padrões moleculares de fungos, como β -glucanas e mananas expostas na parede celular da *Candida albicans* não opsonizadas (Ezekowitz et al., 1984; Linehan, Martínez-Pomares, Gordon, 2000, van Bruggen et al., 2009; Brown, 2011), tendo este reconhecimento de carboidratos mediado pelo sítio 'lectina-like' do CR3 (Diamond et al., 1993; Thornton et al., 1996). Dessa maneira, o efeito interferente do EEBd no ensaio microbida também não pode ser atribuído a modulação na expressão do CR3, visto que tanto o extrato quanto ácido cafeico não alteraram os níveis de expressão deste receptor do complemento (**Figura 4.18 A1,B1**).

Diante do conjunto de informações já expostas, sugere-se como possíveis explicações para o efeito não interferente do ácido cafeico sobre o killing do fungo pelos PMNs, as seguintes observações:

i. Embora o ácido cafeico apresente uma excelente atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio, tais como H_2O_2 , HOCl, $O_2^{\bullet-}$, acredita-se que essa habilidade ocorre de maneira modulada, e não em sua totalidade. Além disso, sabe-se que o composto pouco interfere na atividade da NADPHoxidase (Hyogo et al., 2010), desse modo, a produção de ânion superóxido se mantém preservada, bem como, por dismutação do produto dessa enzima, também haverá a geração de peróxido de hidrogênio. Essa última espécie reativa, por sua vez, será o substrato alvo de outra enzima-chave do metabolismo oxidativo: a MPO. Apesar dos resultados deste trabalho demonstrarem que o fenólico é capaz de inibir a atividade dessa enzima-chave na sua forma pura, acredita-se que essa ação do ácido cafeico provavelmente não ocorra na mesma intensidade em neutrófilos ativados, pois a enzima é liberada tanto no interior do fagolisossomo quanto no meio extracelular. Assim, a ação inibitória deste composto demonstrar ser limitada nos fagolisossomos, nos auxiliando na compreensão da substância não inibir a atividade microbida dos neutrófilos frente a *Candida albicans*. De modo geral, mesmo ocorrendo a ação *scavenger* pelo composto, presume-se que o metabolismo oxidativo destas células ainda estaria atuante, o que é crucial para eliminação do fungo.

ii. Do mesmo modo, através da ativação os neutrófilos expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que produz óxido nítrico (NO^*) por meio da reação de arginina e oxigênio.

O óxido nítrico, por sua vez, é altamente reativo e se transforma rapidamente em peroxinitrito (ONOO^-) na presença do ânion superóxido (Miramón, Kasper, Hube, 2013). A produção dessas espécies reativas de nitrogênio (ERN) demonstra ser restringida na região intracelular do fagócito, uma vez que a iNOS é somente localizada intracelularmente, além da meia-vida curta das ERN (Fang, 2004). Portanto, acredita-se que as ERN também possui uma contribuição, em parte, na eliminação do fungo em fagócitos (Vazquez-Torres, Jones-Carson, Balish, 1996), pois elas podem promover um *stress* combinatório com as ERO. (Kaloriti et al., 2012).

iii. Outro mecanismo de eliminação da *Candida albicans* é a indução das NETs (*neutrophil extracellular traps*) (Urban et al., 2006), que são formadas durante um processo único de morte celular de neutrófilos, denominado NETosis. Neste processo, essas células liberam uma rede de fibrilas de cromatina revestidas com o conteúdo de neutrófilos, tais como as proteases de serina, peptídeos antimicrobianos (por exemplo, de calprotectina), e outros compostos microbicidas (Urban et al., 2009, Vorobjeva, Pinegin, 2014). No entanto, na literatura existem controvérsias sobre a indução das NETs por esse fungo, tendo autores que sustentam que ambas morfologias (levedura e filamentosa) são capazes de promover tal função biológica, enquanto outros apoiam que somente a forma filamentosa é hábil de induzir a mesma ação (Branzk et al., 2014).

iv. Os PMNs também possuem mecanismos não-oxidativos no processo de killing, que estão relacionados à produção uma infinidade de peptídeos e proteínas que atuam de maneira direta ou indireta na eliminação de micróbios (Amulic et al., 2012). Dentre essas proteínas, a elastase de neutrófilos possui a capacidade de clivar fatores de virulência bacterianos e de proteínas da membrana externa (Amulic et al. 2012), sendo também essencial na proteção contra *C. albicans* (Reeves et al., 2002). A lactoferrina é outro exemplo de peptídeo antimicrobiano, abundante nos grânulos secundários de neutrófilos, cuja função é se ligar ao ferro. Contudo, sua ação sobre a *Candida* está relacionada na indução de apoptose nas células fúngicas mediante processo de efluxo de K^+ (Andrés, Viejo-Díaz, Fierro, 2008). A calprotectina é uma proteína também presente no citoplasma de neutrófilos, cujo modo de ação é sequestrar cátions metálicos bivalentes, como magnésio (Mg^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), que são micronutrientes essenciais para a *Candida*. (Miramón, Kasper, Hube, 2013)

Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer qual(is) o(s) mecanismo(s) de ação estão envolvidos no efeito interferente do extrato vegetal, bem como identificar

qual(is) o(s) seus metabólitos secundários responsáveis por promoverem tais ações interferente sobre a função microbicida dos PMNs.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a ação inibitória parcial do metabolismo oxidativo de neutrófilos, observada pelo EEBBd, pode ser atribuída em parte pela atuação do ácido cafeico, que demonstrou inibir aquela função biológica. Essa consideração condiz ao trabalho de Figueiredo-Rinhel e colaboradores (2013), no qual aponta o ácido cafeico como um marcador químico, dentre os metabólitos secundários da *Baccharis*, na ação antioxidante desempenhada pelo extrato vegetal sobre o *burst* respiratório.

Além disso, este trabalho vem a acrescentar que, o papel antioxidante das amostras investigadas não está associado somente em nível de ação *scavenger* das espécies reativas de oxigênio, mas também na ação inibitória da mieloperoxidase, umas das principais e importantes enzimas responsáveis pelo metabolismo respiratório dos neutrófilos. Além de ser considerado um potente antioxidante, o fenólico investigado demonstrou não interferir em outras funções efetoras essenciais, como a fagocitose e o *killing* de patógenos. Do mesmo modo, a ação imunomoduladora do ácido cafeico não é medida por alterações na viabilidade celular ou nos níveis de expressão de receptores de membrana nas condições analisadas.

Em suma, o conjunto de resultados obtido pode nos auxiliar no entendimento do mecanismo de ação destes compostos naturais sobre as funções efetoras de neutrófilos, e no desenvolvimento de novos fármacos candidatos à aplicação conjunta com os tratamentos empregados em doenças inflamatórias mediadas por neutrófilos.

6. CONCLUSÃO

O extrato etanólico bruto das folhas da *Baccharis dracunculifolia* (EEBBd) e o ácido cafeico inibiram de modo dependente de concentração o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos de indivíduos saudáveis, estimulados por agente solúvel (PMA) e particulados (IC e IC-SHN). Embora ambas amostras não exerçam alterações nos níveis de expressão dos receptores de membrana (FcγRIIa, FcγRIIb e CR3), esse efeito inibitório foi mais pronunciado nas células estimuladas com o agente independente de receptor, do que com aqueles dependentes de receptores.

A ação inibitória mais eficaz do ácido cafeico no metabolismo oxidativo dessas células ocorreu mediante a atividade antioxidante, envolvendo a atuação sequestradora das espécies reativas oxidantes (H₂O₂, HOCl) e inibição da atividade da enzima MPO. Além disso, presume-se que o fenólico interfira na atividade da PKC, uma molécula sinalizadora central e comum entre as vias de sinalizações dos diferentes estímulos.

Nas condições experimentais empregadas, o ácido cafeico não alterou a viabilidade celular, inibiu fracamente a fagocitose e não exerceu alterações na habilidade microbicida dos neutrófilos frente a *Candida albicans*. Indicando que, o fenólico não é o metabólito secundário da *Baccharis* responsável pelos efeitos interferentes nessas funções observados nas células tratadas com o extrato vegetal. Assim, este fenólico demonstra exercer uma ação exclusiva na modulação do *burst* respiratório de neutrófilos, sem observar interferências em outras funções efectoras primordiais para resposta imune dessas células.

Assim, o ácido cafeico exerce uma ação imunomoduladora em neutrófilos humanos nos parâmetros avaliados e dependentes da concentração, sem efeitos citotóxicos. Sendo que este composto fenólico contribui efetivamente para ação inibitória do extrato da *Baccharis* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados.

7. REFERÊNCIAS

- Abad, M.J., Bermejo, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*. 2007, v.7, p.76-96.
- Agner, K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta Chem. Scand*. 1941, A2 (Suppl. 8), p.1–62.
- Agwu, D.E., McPhail, L.C., Sozzani, S., Bass, D.A., McCall, C. E. Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase. *J. Clin. Invest*. 1991, v.88, p.531-539.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M., Wagner, H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*. 2002, v.32, n.7, p.1958-68.
- Akashi-Takamura, S., Miyake, K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 2008, v.20, p.420-5.
- Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 , v.4, n.7, p.499-511.
- Almajano, M.P., Carb'o, R., Delgado, M.E., Gordon, M.H. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J. Food Sci*. 2007, v.72, p.C258-C263.
- Amorati, R., Pedulli, G.F., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L. Solvent and pH Effects on the Antioxidant Activity of Caffeic and Other Phenolic Acids. *J Agr Food Chem*. 2006, v.54, n.8, p.2932-2937.
- Amulic, B. Cazalet, C. Haveys, G.L.; Metzler, K.D.; Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol*. 2012, v.30, p.459-489.
- Andrade, M.F. , Kabeya, L.M., Azzolini, A.E.C.S. , Santos, E.O.L., Figueiredo-Rinhel, A.S.G., Paris, M.R.P., Emery, F.S., Pupo, M.T., Lucisano-Valim, Y.M. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. *Intern. Immunopharm*. 2013, v.15, p.387-394.
- Andrés, M.T., Viejo-Díaz, M., Fierro, J.F. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K⁺ -channel-mediated K⁺ efflux. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, v.52, p.4081-4088.
- Andrews, P.C., Krinsky, N.I. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymatically active hemi-myeloperoxidase. *J. Biol. Chem*. 1981, v.256, p.4211–4218.

Andrews, S., Stephens, L.R., Hawkins, P. T. PI3K class IB pathway in neutrophils. *Sci. STKE*. 2007, v. 2007:407.

Asano, M., Iwahashi, H. Caffeic Acid Inhibits the Formation of 7-Carboxyheptyl Radicals from Oleic Acid under Flavin Mononucleotide Photosensitization by Scavenging Singlet Oxygen and Quenching the Excited State of Flavin Mononucleotide. *Molecules*. 2014, v.19, p.12486-12499.

Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappaB. *J Immunol*. 2004, v.172, p.2522-9.

Atkin, C.L., Andersen, M.R., Eyre, H.J. Abnormal neutrophil myeloperoxidase from a patient with chronic myelocytic leukemia. *Arch. Biochem. Biophys*. 1982, v.214, p.284-292.

Bachiega, T. F., De Souza, J.P.B., Bastos, J.K., Sforcin, J.M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. *Natural Product Research*. 2012, v.17, n.1, p.1-5.

Bainton, D.F., Ullyot, J.L., and Farquhar, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med*. 1971, v.134, p.907-934.

Balasubramanian, N., Advani, S.H., Zingde, S.M. Protein kinase C isoforms in normal and chronic myeloid leukemic neutrophils. Distinct signal for PKC alpha by immunodetection on PVDF membrane, decreased expression of PKC alpha and increased expression of PKC delta in leukemic neutrophils. *Leuk Res*. 1998, v.22, p.597-604.

Balasubramanian, N., Advani, S.H., Zingde, S.M. Protein kinase C isoforms in normal and leukemic neutrophils: altered levels in leukemic neutrophils and changes during myeloid maturation in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2002, v.26, p.67-81.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Sforcin, J.M., Frete, X., Kujumgiev, A., Maimoni-Rodella, R., Popov, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z Naturforsch C*. 1999, v.54, n.5-6, p.401-405.

Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J*. 2014, v.8, n.28, p.1-8.

Bardoel, B.W.; Kenny, E.F.; Sollberger, G.; Zychlinsky, A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host Microbe* 2014, v.15, n.5, p.526-36.

Bastos, E.M. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001, 137p. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Bauldry, S. A., Bass, D. A., Cousart, S. L. and McCall, C. E. Tumor necrosis factor alpha priming of phospholipase D in human neutrophils. Correlation between phosphatidic acid production and superoxide generation. *J. Biol. Chem*. 1991, v.266, n.7, p.4173- 4179.

- Bedard, K., Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007, v.87, n.1, p.245-313.
- Beg, A.A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* 2002, v.23, p.509–512.
- Behnen, M., Leschczyk, C., Möller, S., Batel, T., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J Immunol.* 2014, v.193, n.4, p.1954-65
- Bell, J.K, Mullen, G.E.D., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., Segal, D.M. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology.* 2003, v.24, n.10, p.528-533.
- Bertaram, A., Ley, K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp.* 2011, v.59, p.79-87.
- Berton, G., Lowell, C.A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal.* 1999, v.11, n.9, p.621-35.
- Blair-Johnson, M., Fiedler, T., Fenna, R. Human myeloperoxidase: structure of a cyanide complex and its interaction with bromide and thiocyanate substrates at 1.9Å° resolution. *Biochemistry.* 2001, v.40, p.13990–13997.
- Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958, v.181, p.1199–1200.
- Blumberg, P.M. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 1988, v.48, p.1–8.
- Bohlmann, F. et al. Five Diterpenes and Other Constituentes from nine *Baccharis* Species. *Phytochemistry.* 1981, v.20, p.1907-1913.
- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010, v.33, p.657–670.
- Borregaard, N., Sorensen, O.E., Theilgaard-Monch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007, v.28, p.340-45.
- Bos, A., Wever, R., Roos, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1978, v.525, p.37–44.
- Bradshaw, J.M. The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches. *Cellular Signalling.* 2010, v.22, p.1175–1184.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Maximiliano, Q.W. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014, v.15, n.11, p.1017-1025.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004, v.303, n.5663, p.1532-1535.
- Brown, G.D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 2011, v.29, n.1, p.1-21.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M. et al. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *J Experim Med.* 2002, v.196, n.3, p. 407-412.
- Brumell, J.H., Chan, C.K., Butler, J. et al. Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1997, v.272, p.875-882.
- Brunkhorst, B.A., Strohmeier, G., Lazzari, K., Weil, G., Melnick, D., Fleit, H.B., et al. Differential roles of Fc γ RII and Fc γ RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. *J Biol Chem.* 1992, v.267, n.29, p.20659-66.
- Búfalo, M.C., Bordon-Graciani, A.P., Conti, B.J., de Assis Golim, M., Sforcin, J.M. The immunodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2014, v.66, p.1497-1504.
- Búfalo, M.C., Candeias, J.M., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Sforcin, J.M. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Nat Prod Res.* 2010, v.24, n.18, p.1710-1718.
- Búfalo, M.C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Batista, M.T., Sforcin, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 2013, v.149, n.1, p.84-92.
- Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., De Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K. and Sforcin, J.M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J. Applied Microbiology.* 2009, v.107, p.1669-1680.
- Búfalo, M.C., Sforcin, J.M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. *J. Pharm Pharmacol.* 2015, v.6, n.5, p.740-745.
- Burns, J. et. al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chemistry*, 2001, v.49, p.5797-5808.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I.V., Rangel, A.O., Hogg, T.A. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2009, v.135, n.2, p.144-51.
- Carrigan, S.O., Pink, D.B., Stadnyk, A. Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18. *J. Leukoc. Biol.* 2007, v.82, p.1575-1584.

- Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev.* 2010,v. 9, n.8, p.531-5.
- Cestari, S.H., Bastos, J.K., Di Stasi, L.C. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of *Baccharis dracunculifolia* in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011, Article ID 524349, pages 9.
- Chae, Y.C., Kim, J.H., Kim, K.L., Kim, H.W., Lee, H.Y., Heo, W.D., Meyer, T., Suh, P.G., Ryu, S.H. Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 2008, v.19, p.3111-3123.
- Chakrabarti, S., Patel, K.D. The atypical zeta (zeta) isoform of protein kinase C regulates CD11b/CD18 activation in human neutrophils. *Microcirculation.* 2008, v.15, p.555–567.
- Chang, W., Hsieh, C., Hsiao, M., Lin, W., Hung, Y., Ye, J. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2010, v.49, p.419–424.
- Chen, J.H., Ho, C.T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compound. *J. Agric. Food Chem.* 1997, v.45, p.2374-2378.
- Chen, M.L., Wu, S., Tsai, T.C., Wang, L.K., Chou, W.M., Tsai, F.M. The caffeic acid in aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* enhances neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2014, v.36, n.6, p.390-396.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R. Akt Phosphorylates p47 phox and Mediates Respiratory Burst Activity in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 2003, v.170, p.5302-5308.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J, Gusovsky, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999, v.274, p.10689-10692.
- Chuang, F.Y., Sassaroli, M., Unkeless, J.C. Convergence of Fcγ receptor IIA and Fc γ receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J. Immunol.* 2000, v.164, p.350–360.
- Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C. et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism FASEB J. 2004, v.18, p.1670-1681.
- Corrotte, M., Chasserot-Golaz, S., Huang, P., Du, G., Ktistakis, N.T., Frohman, M.A., Vitale, N., Bader, M.F. and Grant, N.J. Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic.* 2006, v.7, p.365-377.
- Costa, M., Ximenes, V.F., Fonseca, L.M. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. *Biol. Pharm. Bull, Tokyo.* 2004, v.27, n.8, p.1183-1187.

- Crockett-Torabi, E., Fantone, J. Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fc γ receptor-specific mechanisms. *J Immunol.* 1990, v.145, n.9, p.3026-32.
- Da Silva Filho, A.A., De Sousa, J.P., Soares, S., Furtado, N.A. et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Z Naturforsch C.* 2008, v.63, n.1-2, p.40-46.
- Da Silva Filho, A.A., Pires-Bueno, P.C., Gregório, L.E., Andrade e Silva, M.L., Albuquerque, S., Bastos, J.K. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *J Pharm Pharmacol.* 2004, v.56, n.9, p.1195-1199.
- Da Silva Filho, A.A., Resende, D.O., Fukui, M.J., Santos, F.F., Pauletti, P.M., Cunha, W.R., Silva, M.L., Gregório, L.E., Bastos, J.K., Nanayakkara, N.P. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 2009, v.80, n.8, p.478-82.
- Dahlgren C., Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods.* 1999, v.232, p. 3–14.
- Dai, X., Jayapal, M., Tay, H.K., Reghunathan, R., Lin, G., Too, C.T. et al. (2009). Differential signal transduction, membrane trafficking, and immune effector functions mediated by Fc γ RI versus Fc γ RIIa. *Blood.* 2009, v.114, n.2, p.318-27.
- Dang, P.M., Hakim, J., Périanin, A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994, v.349, p.338–342.
- Dang, PM-C., Raad, H., Derkawi, R.A., Boussetta, T., Paclet, M.H., Belambri, S.A. et al. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol.* 2011, v.82, n.9, p.1145–52.
- De Lucia, M., Panzella, L., Crescenzi, O., Napolitano, A., Barone, V., D’Ischia, M. The catecholic antioxidante piceatannol is an effective nitrosation inhibitor via na unusual doble bond nitration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, v.16, p.2238-2242.
- De Sousa, J.P.; Da Silva-Filho, A.A.; Bueno, P.C.; Gregório, L.E.; Furtado, N.A.; Jorge, R.F.; Bastos, J.K. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. *Phytochemical analysis: PCA.* 2009, v.2, n.1, p.24-32.
- De Sousa, J.P.B., Da Silva Filho, A.A., Bueno, P.C P., Gregório, L.E., Furtado, N.A. J.C., Jorge, R.F, Bastos, J.K. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. *Phytochem. Anal.* 2009, v.20, p.24–32.

De Vita, D., Friggeri, L., D'Auria, F.D., Pandolfi, F., Piccoli, F., Panella, S., Palamara, A.T., Simonetti, G., Scipione, L., Di Santo, R., Costi, R., Tortorella, S. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014, v.24, n.6, p.1502-1505.

Decoursey T. E., Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci*. 2005, v.62, p.2173–2193.

Dekker, L.V, Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., Mcdermott, A., Roes, J., Segal, A.W. Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J*. 2000, v.347, n.1, p.285–289.

Dennehy, K.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Brown, G.D. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following coactivation of dectin-1 and TLR signaling pathways,” *European Journal of Immunology*. 2009, v.39, n.5, p. 1379–1386.

Devalia, V., Thomas, N.S., Roberts, P.J. et al. Down-regulation of human protein kinase C alpha is associated with terminal neutrophil differentiation. *Blood*. 1992, v.80, p.68–76.

Dhungyal, B., Koirala, P., Sharma, C., Jha, D.K. Caffeic Acid - A Potent Phytocompound against Diabetes Mellitus. *SMU Medical Journal*, 2014, v.1, n.2, p.152-161.

Diamond, M.S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J.K., Corbi, A.L., Springer, T.A. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*. 1993, v.120, p.1031–1043.

Dos Santos, D.A., Fukui Mde, J., Dhammika Nanayakkara, N.P., Khan, S.I., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Andrade, S.F., Da Silva Filho, A.A., Quintão, N.L. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol*. 2010, v.127, n.2, p.543-50.

Dupré-Crochet, S., Erard, M., Nüße, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013, v.94, n.4, p.657-70

Dusi, S., Donini, M., Della Bianca, V., Rossi, F. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 2 is involved in the activation of phosphoinositide hydrolysis by Fc receptors in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, v.201, n.3, p.1100–1108.

Dusi, S., Donini, M., Rossi, F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox, *Biochem. J*. 1996, v.314 (Pt 2), p.409–412.

Dyrbukt, J.M., Bishop, C., Brooks, W.M., Thong, B., Eriksson, H., Kettle, A.J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med*. 2005, v.39, p.1468–77.

- Edberg, J.C., Moon, J.J., Chang, D.J., Kimberly, R.P. Differential regulation of human neutrophil FcγRIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca²⁺ transients. *J. Biol. Chem.* 1998, v.273, p.8071–8079.
- El Kebir, D., Jozsef, L., Pan, W., Filep, J.G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res.* 2008, v.103, p.352–359.
- El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Marie, J.-C., Braut-Boucher, F. “p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases,” *Experim Molec Med.* 2009, v. 41, n. 4, p.217–225.
- El-Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., Babior, B.M. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys.* 1996, v.334, n.2, p.395-400.
- Ezekowitz, R.A., SIM, R.B., Hill, M. Gordon, S. Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptor for complement in uptake zymosan. *J. Exp. Med.* 1984, v.159, n.1, p.244-260.
- Fahey, J.L., Wunderlich, J., Mishell, R. The immunoglobulins of mice. I – Four major classes of immunoglobulins: 7S2-, 7S1-, 1A, 2A- and 18S1M- globulins. *J Exp Med.* 1964, v.120, n.2, p.223-42.
- Fallman, M., Andersson, R., Andersson, T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol.* 1993, v.151, n.1, p.330-8.
- Fang, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Rev. Microbiol.* 2004, v.2, p.820-832.
- Faurschou, M., Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003, v.5, p.1317-1327.
- Faurschou, M., Sørensen, O.E., Johnsen, A.H., Borregaard, N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Bioch Biophys Acta.* 2002, v.1591, p.29-35.
- Ferronato, R.; Marchesan, E. D.; Bednarski, F.; Alencar, S. M.; Onofre, S. B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.* 2006, v.10, n.2, p.67-70
- Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B., Netea, M.G., Adema, G.J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular Microbiology.* 2008, v. 10, n.10, p. 2058– 2066.

Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8Å^o resolution. *J Biol Chem*, 2000, v.275, p.11964–11971.

Figueiredo, A.S.G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.** 2010. Dissertação de Mestrado. Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Figueiredo-Rinhel, A.S.G., Kabeya, L.M., Bueno, P.C.P., Jorge-Tiossi, R.F., Azzolini, A.E.C.S., Bastos, J.K., Lucisano-Valim, Y.M. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J Ethnopharm.* 2013, v.150, n.2, p.655-664.

Flesch, B.K., Neppert, J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G. *J Clin Lab Anal.* 2000, v.14, p.141-56.

Flo, T.H., Halaas, O., Torp, S., et al. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol.* 2001, v.69, n.3, p. 474-81.

Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D.J., Land, E.J., Truscott, T.G., Rice-Evans, C.A. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic Biol Med.* 1999, v.26, p.1202–1208.

Fontayne, A., Dang, P.M.-C., Gougerot-Podidalo, M.-A., Benna, J.E. Phosphorylation of p47phox Sites by PKC α , β II, δ , and ζ : Effect on Binding to p22phox and on NADPH Oxidase Activation. *Biochemistry.* 2002, v.41, p.7743-7750.

Forbes, L.V., Sjögren, T., Auchère, F., Jenkins, D.W., Thong, B. et al. Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. *Journal of Biological Chemistry.* 2013, v.288, n.51, p.36636-36647.

Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Robert, T., Ghitti, G., Deby-Dupont, G., Neven, P., Serteyn, D. Differentiation between stoichiometric and anticatalytic antioxidant properties of benzoic acid analogues: a structure/redox potential relationship study. *Chem Biol Interact.* 2013, v.206, n.2, p.194-203.

Freshney, R.I. Measurement of viability and cytotoxicity. In:_____. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 3 ed. New York: John Wiley & Sons, Cap. 19, p.287-307, 1994.

Fuchs, A., Dagher, M.C., Faure, J., Vignais, P.V. Topological organization of the cytosolic activating complex of the superoxide-generating NADPH-oxidase. Pinpointing the sites of interaction between p47phox, p67phox and p40phox using the twohybrid system, *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, v.1312, p.39–47.

- Fuchs, T.A., 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. *The Journal of Cell Biology*. 2007, v.176, n.2, p.231-241.
- Fukuda, M., Ohkoshi, E., Makino, M., Fujimoto, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull*. 2006, v.54, n.10, p.1465-1468.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agr Food Chemy*. 2000, v.48, n.8, p.3597- 3604.
- Furtmüller, P.G., Burner, U., Obinger, C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry*. 1998, v.37, n.51, p. 17923-30.
- Furtmuller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*. 2006, v.445, p.199–213.
- Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17(3): 638-50.
- Gay, N.J., Gangloff, M., Weber, A.N. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol*. 2006, v. 6, n.9, p.693-8.
- Gelderman, M.P., Stuart, R., Vigerust, D., Fuhrmann, S., Lefkowitz, D.L., Allen, R.C., Lefkowitz, S.S., Graham, S. Perpetuation of inflammation associated with experimental arthritis: the role of macrophage activation by neutrophilic myeloperoxidase. *Mediators Inflamm*, 1998, v.7, p.381–389.
- Geraldes, P., King, G.L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010, v.106, p.1319–1331.
- Gessner, J.E., Heiken, H., Tamm, A., Schmidt, R.E. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol*, 1998, v.76, p.231-248.
- Goh, F.G., Midwood, K.S. Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012, v.51, p.7-23.
- Gomez-Cambronero, J., Keire, P. Phospholipase D: a novel major player in signal transduction. *Cell Signal*. 1998, v.10, p.387-397.
- Groemping, Y., Rittinger, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J*. 2005, v.386, p.401-416.
- Groves E., Dart A.E., Covarelli, V., Caron, E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 2008, v.65, n.13, p.1957-76.
- Guan, Y., Ranoa, D.R., Jiang, S. et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 2010; v.184, n.9, p.5094-103.

- Guimaraes, N.S.S., Mello, J.C., Paiva, J.S., Bueno, P.C.P., Berretta, A.A., Torquato, R.J., Nantes, I.L., Rodrigues, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, v.50, n.3-4, p.1091-1097.
- Gülçin, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006, v.217, p.213–220.
- Hakkim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., Waldmann, H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*. 2011, v.7, p.75–77.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*. 1998, v.92, n.9, p.3007-3017.
- Harrison, J.E., Pabalan, S., Schultz, J. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1997, v.493, p.247– 259.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988, v.52, p.269-79.
- Hattermann, K., Picard, S., Borgeat, M., Leclerc, P., Pouliot, M., Borgeat, P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *Faseb J*. 2007 v.21, p.1575–85.
- Hawkins, P.T., Anderson, K.E., Davidson, K., Stephens, L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Transac*. 2006, v.34, n.5, p.647–662.
- Hayashi, F., Means, T. K., Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003, v.102, n.7, p.2660-2669.
- Hed, J. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. *Methods in enzymology*. 1986, v.132, p.198-204.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003, v.33, n.11, p.2987-97.
- Helberg, C., Molony, L., Zheng, L., Andersson, T. Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃,” *The Biochem J*. 1996, v.317 (Pt 2), p.403-9.
- Herrmann, K. On caffeic acid and chlorogenic acid. *Pharmzie*. 1956, v.11, p.433 – 449.
- Heyworth P.G., Bohl, B.P., Bokoch, G.M., Curnutte, J.T. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558, *J. Biol. Chem*. 1994, v.269, p.30749–30752.

- Heyworth, P.G., Curnutte J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H., Clark, R.A. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558, *J. Clin. Invest.* 1991, v.87, p.352–356.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda C. et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science*. 2000, v.287, n.5455, p.1049–1052.
- Hoogland, H.; van Kuilenburg, A.; van Riel, C.; Muijsers, A.O.; Wever, R. Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III. *Biochim Biophys Acta*. 1987, v.916, p.76-82.
- Hu, T., Liu, Z., Shen, X. Roles of phospholipase D in phorbol myristate acetate-stimulated neutrophil respiratory burst. *J Cell Mol Med*. 2011, v.15, n.3, p.647-53.
- Huizinga, T.W., Dolman, K.M., van der Linden, N.J., Kleijer, M., Nuijens, J.H., von dem Borne, A.E., Roos, D. Phosphatidylinositollinked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J Immunol*. 1990, v.144, p.1432–143.
- Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002, v.110, p.673–687.
- Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992, v.69, p.11–25
- Hyogo, A., Kobayashi, T., Garciam Del Saz, E., Seguchi, H. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid, Ferulic Acid, and Caffeic Acid in Human Neutrophils Using a Fluorescent Substance. *Int J Morphol*. 2010, v.28, n.3, p.911-920.
- Jakus, Z., Berton, G., Ligeti, E., Lowell, C.A., Mócsai, A. Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity Fc γ Rs: full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J Immunol*. 2004, v.173, n.3, p.2068-77.
- Jakus, Z., Simon, E., Frommhold, D., Sperandio, M., Mócsai, A. Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med*. 2009; v.206, n.3, p.577-93.
- Jancar, S., Crespo, M.S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol*, 2005, v.26, p.48–55.
- Jankowski, A., Scott, C.G, Gristein S. Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J Biol Chem*. 2002, v.277, p.6059-66.
- Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Xie, W., Simon, M.I, Wu, D. Roles of phospholipase C β 2 in chemoattractant-elicited responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, v. 94, n.15, p.7971–7975.

Jiang, Q., Håkansson, M., Suomi, J., Ala-KlemE, T., Kulmala, S. Cathodic electrochemiluminescence of lucigenin at disposable oxide-coated aluminum electrodes. J Electroan Chem. 2006, v.591, n.1, p.85–92.

Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O. et al. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. Journal of Infectious Diseases. 2003, v.188, n.1, p 165-172.

Kabeya, L.M. **Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos.** 2002. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

Kabeya, L.M. **Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura-atividade.** 2006. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Kabeya, L.M., De Marchi, A.A., Kanashiro, A., Lopes, N.P., Da Silva, C.H., Pupo, M.T., Lucisano-Valim, Y.M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. Bioorg Med Chem, 2007, v.15, n.3, p.1516-1524.

Kabeya, L.M., Fuzissaki, C.N., Andrade, M. F., Azzolini, A.E.C.S., Taleb-Contini, S.H., Vermelho, R.B., Lopes, J., Lucisano-Valim, Y.M.L. 4-Methylcoumarin derivatives inhibit the human neutrophil oxidative metabolism and elastase activity. J of Med Food, 2013a, v.16, p.692-700.

Kabeya, L.M., Fuzissaki, C.N., Taleb-Contini, S.H., Ferreira, A.M., Naal, Z., Santos, E.O.L., Figueiredo-Rinhel, A. S.G., Azzolini, A.E.C.S., Vermelho, R.B. , Malvezzi, A., Do Amaral, A.T., Lopes, J.L.C., Lucisano-Valim, Y.M. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. Chemico-Biolog Interac. 2013b, v.206, p.63-75.

Kaloriti, D., Tillmann, A., Cook, E. et al. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. Med Mycol. 2012, v.50, n.7, p.699-709.

Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.G., Lee, J.O. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6heterodimer. Immunity. 2009, v. 31, n.6, p.873-84.

Kang, K.A., Lee, K.H., Zhang, R., Piao, M., Chae, S., Kim, K.N. et al. Caffeic acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung fibroblast cells. Biol Pharm Bul. 2006, v.29, p.1820–1824.

- Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J et al. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*. 2009, v.30, n.2, p.321–330.
- Karamac, M., Kosinska, A., Pegg, R. B. Comparison of Radical-Scavenging Activities for Selected Phenolic Acids. *Pol J Food Nutr Sci*. 2005, v.14/55, n.2, p.165–170.
- Karimi, G., Levin, C.H., Dagher, M.C., Baciou, L., Bizouarn, T. Assembly of phagocyte NADPH oxidase: a concerted binding process? *Biochim Biophys Acta*. 2014, v.1840, n.11, p.3277-83.
- Karsten, C.M., Köhl, J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiol*. 2012, v.217, p.1067-1079.
- Karthikesan, K., Pari, L. Beneficial effect of caffeic acid on alcohol induced alterations in lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2007, v.17, p.527–34.
- Kato, Y., Nagao, A., Terao, J., Osawa, T. Inhibition of Myeloperoxidase-catalysed Tyrosylation by Phenolic Antioxidants *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003, v.67, n.5, p.1136-1139.
- Khanduja, K.L., Avti, P.K., Kumar, S., Mittal, N., Sohi, K.K., Pathak, C.M. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2006, v.1760, n.2, p.283-289.
- Kilpatrick, L.E., Sun, S., Li, H. et al. Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of delta- PKC. *J Leukoc Biol*. 2010, v.87, p.153–164.
- Kim, C., Dinanuer, M.C. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathway. *J. Immunol*. 2001, v.166, p.1223-1232.
- Kimberly, R.P., Ahlstrom, J.W., Click, M.E., Edberg, J.C. The glycosyl phosphatidylinositol-linked FcγRIII PMN mediates transmembrane signalling events distinct from FcγRII. *J Exp Med*. 1990, v.171, n.4, p.1239-55.
- Kimberly, R.P., Salmon, J.E., Edberg, J.C. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum* 1995, v.38, p.306-14.
- Kjeldsen, L., Bjerrum, O.W., Askaa, J., Borregaard, N. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J*. 1992, v.287, p.603-610.
- Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005, v.77, n.5, p.598-625.

- Klebanoff, S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980, v.93, p. 480–489.
- Kobe, B., Kajava, A.V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001, v.11, p.725–732.
- Köhl, J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol. Res.* 2006, v.34, p.157–176.
- Kolaczowska, E., Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2013, v.13, p.159–175.
- Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Lao, A., Fujimoto, Y., Tatsuno, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1984, v.792, p.92-97.
- Krauss, J.C., Pooh Xue, W., Mayo-Bond, L., Todd, R.F, Petty, H.R. Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol.* 1994, v.153, n.4, p.1769-1777.
- Krol, W., Scheller, S., Czuba, Z., Matsuno, T., Zydowicz, G., Shani, J., Mos, M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J Ethnopharmac.* 1996, v.5, p.19 -25.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N.R., Rieber, N. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLOS Pathogens.* 2015, v.11, n.3, e1004651.
- Kulkarni, S., Sitaru, C., Jakus, Z., Anderson, K.E., Damoulaki, S.G., Davidson, K. et al. PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal.* 2011, v.4, n.168, ra23.
- Kwiatkowska, K., Frey, J., Sobota, A. Phosphorylation of Fc γ RIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J Cell Sci.* 2003, v.116 (Pt3), p.537-50.
- Lapouge, K., Smith, S.J. Groemping, Y., Rittinger, K. Architecture of the p40–p47– p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox, *J. Biol. Chem.* 2002, v.277, p.10121–10128.
- Laranjinha, J., Vierira, O., Almeida, L., Madeira, v. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acid. *Biochem. Pharmacol.* 1996, v.51, p.395-402.
- Lau, D., Baldus, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther.* 2006, v. 111, p.16–26.
- Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Daiber, A., Gehling, U.M., Brummer, J., Rudolph, V., Munzel, T., Heitzer, T., Meinertz, T., Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, v.102, p.431–436.

- Laudanna, C., Mochly-Rosen, D., Liron, T. et al. Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1998, v.273, p.30306–30315.
- Lefkowitz, D.L., Gelderman, M.P., Fuhrmann, S.R., Graham, S., Starnes, J.D., Lefkowitz, S.S., Bollen, A., Moguilevsky, N. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clin Immunol.* 1999, v.91, p.145–155.
- Lefkowitz, D.L., Mills, K., Morgan, D., Lefkowitz, S.S. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992, v.199, p.204–210.
- Leitão, D.P.; Filho, A.A.; Polizello, A.C.; Bastos, J.K.; Spadaro, A.C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological & Pharmaceutical.* 2004, v.27, n.11, p.1834-1839.
- Lemos, M., De Barros, M.P., Sousa, J.P.B., Da Silva Filho, A.A., Bastos, J.K., De Andrade, S.F. *Baccharis dracunculifolia* the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *J. Pharmacy and Pharmacology.* 2007, v.59, n.4, p.603–608.
- Leslie, R.G.Q. Complement Receptors. *Encyclopedia of life sciences (eLS).* 2001, p.1-9.
- Letourneur, O., Kennedy, I.C., Brini, A.T., Ortaldo, J.R., O'Shea, J.J., Kinet, J.P. Characterization of the family of dimers associated with FC receptors (FcγRI and FcγRIII). *J Immunol* 1991, v.147, p.2652-6.
- Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A., Venkatesh, D. et al. The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe.* 2011, v.10, n.6, p.603-15.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D. Roles of PLC-β2 and -β3 and PI3ky in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.* 2000, v.287, n.5455, p.1046–1049.
- Linehan, S.A, Martínez-Pomares, L., Gordon, S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect.* 2000, v.2, n.3, p.279-288.
- Lotz, S., Aga, E., Wilde, I. et al. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol.* 2004, v.75, p. 467–77.
- Lucisano, Y. M., Mantovani, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. *Journal of Immunology.* 1984, v.132, n.4, p.2015-20.

Lucisano, Y.M., Mantovani, B. The role of complement in the stimulation of lysosomal enzyme release by polymorphonuclear leucocytes induced by immune complexes of IgG and IgM. *Immunology* 1988, v.65, p.171-175.

Lucisano-Valim, Y. M. Kabeya, L.M., Kanashiro, A., Russo-Carbolante, E.M., Polizello, A.C., Azzolini, A.E., Silva, S.C., Lopes, J.L., de Oliveira, C.A., Mantovani, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2002, v.4, n.1, p.53-58.

Magnani, C., Issac, V.L.B., Correa, M.A., Salgado, H.R.N. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Anal. Methods*. 2014, v.6, p.3203-3210.

Malle, E., Furtmüller, P.G., Sattler, W., Obinger, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*. 2007, v.152, p.838–854.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J of Clin Nutri*. 2004, v.79, p.727-747.

Martin, C., Burdon, P.C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J. et al. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003, v.19, p. 583-593.

Marzocchi-Machado, C.M., Alves, C.M.O.S., Azzolini, A.E.C.S., Polizello, A.C.M., Carvalho, I.F., Lucisano-Valim, Y.M. Fcγ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2002, v.11, n.4, p.240-248.

Marzocchi-Machado, C.M., Lucisano-Valim, Y.M. Receptores para imunoglobulina G (FcγR). *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2005, v.38, n.1, p.82-95.

Massignani, J.J., Lemos, M., Maistro, E.L., Schaphauser, H.P., Jorge, R.F., Sousa, J.P., Bastos, J.K., De Andrade, S.F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytother Res*. 2009, v.23, n.10, p.1355-60.

Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 2003, v.171, n.6, p.3154-62.

Mayadas, T.N., Cullere, X., Lowell, C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014, v.9, p.181-218.

Mayadas, T.N., Tsokos, G.C., Tsuboi, N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*. 2009, v.120, n.20, p.2012-2024.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, v.388, p.394-7.

- Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007, v.449, p.819–26.
- Mehrotra, A., Shanbhag, R., Chamallamudi, M.R., Singh, V.P., Mudgal, J. Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents. *European Journal of Pharmacology*. 2011, v.666, p.80–86.
- Melendez, A.J., Allen, J.M. Phospholipase D and immune receptor signalling. *Semin Immunol*. 2002, v.14, n.1, p.49-55
- Melo, E.A.; Guerra, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA. Campinas*, 2002, v.36, n.1, p.1-11.
- Middleton Junior, E., Kandaswani, C., Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000, v.52, p.673-751.
- Miramón, P., Kasper, L., Hube, B. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol*. 2013, v.202, n.3, p.183-195.
- Mirzoeva, O.K., Calder, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostag. Leukotr. Ess*. 1996, v.55, n.6, p.441-449.
- Missima, F., Da Silva Filho, A.A., Nunes, G.A., Bueno, P.C.P., De Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Sforcin, J.M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. *J Pharmacy and Pharmacol*. 2007, v.59, n.3, p.463-468.
- Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013; v.210, n.7, p.1283-99.
- Mócsai, A., Ruland, J., Tybulewicz, V.L.J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 2010, v.10, n.6, p.387-402.
- Mócsai, A., Zhou, M., Meng, F. et al. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*. 2002, v.16, p.547–558.
- Naccache, P.H. Signalling in Neutrophils: A Retro Look. *ISRN Physiology*. 2013, v. 2013, Article ID 986320, p.13 .
- Naglik, J. R. *Candida* Immunity. *New Journal of Science*. 2014, v.2014, Article ID 390241, 27p.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009, v.9, n.4, p.1-9.

- Nardini, M., Scaccini, C., Packer, L., Virgili, F. In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract Biochimica et Biophysica Acta. 2000, v.1474, p.219-225.
- Nauseef W. M., Volpp B. D., McCormick S., Leidal K. G., Clark R. A. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. J. Biol. Chem. 1991, v.266, p.5911–5917.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Gow, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nature Reviews Microbiology. 2008, v.6, p.67-78.
- Netea, M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors,” J Clin Invest. 2006, v.116, n. 6, p. 1642–1650.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V. Fcγ receptors: old friends and new family members. Immunity. 2006, v.24, p.19–28.
- Nixon, J.B., McPhail, L.C. Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to triton-insoluble fractions in stimulates human neutrophils: correlation of convetional PKC with activation of NADPH oxidase. The Journal of Immunology. 1999, v.163, p.4574-4582.
- Nordenfelt, P., Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.*, 2011, v.90, n.2, p.:271-84.
- Nordenfelt, P., Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2011, v.90, n.2, p.271-84.
- O'Neill, L.A. Fitzgerald, K.A., Bowie, A.G.. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. Trends Immunol. 2003, v.24, p.286–289.
- O'Brien, X.M., Heflin, K.E., Lavigne, L.M., Yu, K., Kim, M., Salomon, A.R., Reichner, J.S. Lectin site ligation of CR3 induces conformational changes and signaling. J Biol Chem. 2012, v.287, n.5, p.3337-3348.
- Ohara, K., Doi, K., Niizaki, Y., Nagaoka, S.I. A time-resolved luminescence study on singlet oxygen quenching by hydroxycinnamic acids under acidic, neutral and basic conditions. J Photochem Photobiol A: Chem. 2012, v.249, p.1-8.
- Okuro, M., Ogura-Masaki, M., Kobayashi, K., Sakai, M., Takahashi, K., Nagasawa, S. Effect of iC3b binding to immune complexes upon the phagocytic response of human neutrophils: synergistic functions between FcγR and CR3. FEBS Lett. 1995, v.373, p.189-192.
- Olsen, R.L., Little, C. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. Biochem. J., 1984, v.222, p.701–709.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, v.7, p.353–364

Ota, A., Abramovič, H., Abram, V., Ulrih, N.P. Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chemistry.* 2011, v.125, n.4, p.1256-1261.

Paez J, Sellers WR. PI3K/PTEN/Akt pathway. In: Frank DA. *Signal transduction in cancer.* Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 145-67.

Pannala, A.S., Razaq, R., Halliwell, B., Singh, S., Rice-Evans, C.A. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic Biol Med.* 1998, v.24, n.4, p.594-606.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002, v.50, n.9, p.2502-2506.

Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., Fujiwara, F.Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 2004, v.52, p.1100-1103

Parker, L.C., Whyte, M.K., Dower, S.K., Sabroe, I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005, v.77, n.6, p.886-92.

Parreira, N.A., Magalhães, L.G., Morais, D.R., Caixeta, S.C. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers.* 2010, v.7, n.4, p.993-1001.

Paula, F.S., Kabey, L.M., Kanashiro, A., Figueiredo, A.S.G., Azzolini, A.E.C.S., Uyemura, S.A., Lucisano-Valim, Y. M. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food Chem Toxicol.* 2009, v.47, p.163–170.

Paumann-Page, M.; Furtmüller, P.G.; Hofbauer, S.; Paton, L.N.; Obinger, C., Kettle, A.J. Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys.* 2013, v.539, p.51–62.

Perera, P.Y., Mayadas, T.N., Takeuchi, O., Akira, S., Zaks-Zilberman, M., Goyert, S.M., Vogel, S.N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 2001, v.166, p.574-581.

Phenol-Explorer: Database on polyphenol content in foods. Disponível em <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/457>.

Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011, v.17, n.11, p.1381-90.

- Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 2010; v.88, n.1, p.211-20.
- Poulos, T.L.; Kraut, J. The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J.Biol.Chem.* 1980, v.255, p.8199-8205.
- Prasad, N.R., Jeyanthimala, K., Ramachandran, S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *J Photochemistry Photobiol B Biol.* 2009, v.95, p.196–203.
- Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., Parker, L.C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol.* 2011, v.11, n.4, p.397-403.
- Pruchniak, M.P., Arazna, M., Demkow, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013,v.187, n.1, p.68-73.
- Quinn, M.T., Gauss, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases, *J. Leukoc. Biol.* 2004, v.76, p.760–781.
- Rajendra, P.N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., Reddy, B.V. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol. Cell. Biochem.* 2011, v.349, n.1-2, p.11-19.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S. et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* 2002, v.416, p.291–97.
- Remer, K.A., Brcic, M., Jungi, T.W. Toll-like receptor–4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett.* 2003, v.85, p.75–80.
- Repp, R., Valerius, T., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., Platzer, E. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (FcγRI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1991, v.78, p.885–889.
- Rezende, T.P., Do Corrêa, J.O., Aarestrup, B.J., Aarestrup, F.M., De Sousa, O.V., Da Silva Filho, A.A. Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. *Molecules.* 2014, v.19, n.7, p.9257-9272.
- Rodrigues, T., Santos, A.C., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Curti, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis - potentially implicated mechanisms. *British Journal of Pharmacology.* 2002, v.136, p.136-142.
- Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R. A., Schaller, G. Weindl, M., Korting, H. C. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity,” *Medical Mycology.* 2004, v.42, n.6, pp. 485–498.

- Rollet-Labelle, E., Marois, S., Barbeau, K., Malawista, S.E., Naccache, P.H. Recruitment of the cross-linked opsonic receptor CD32A (FcγRIIA) to high-density detergent-resistant membrane domains in human neutrophils. *Biochem J.* 2004, v.381 (pt3), p.919-928.
- Rørving, S., Østergaard, O., Heegaard, N.H.H., Borregaard, N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc Biol.* 2013, v.94, p.711-721.
- Rosales, C., Uribe-Querol, E. Fc receptors: Cell activators of antibody functions. *Advances in Biosc and Biotech.* 2013, v.4, p.21-33.
- Ross, G.D. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion *Imunol Res.* 2002, v.25, n.3, p.219-227.
- Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K. B., Dower, S. K. Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocytes Lipopolysaccharide Responses. *J Immunol.* 2002, v.168, p.4701-4710.
- Sabroe, I., Dower, S.K., Whyte, M.K. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis.* 2005, v.41, Suppl 7, p.S421-S426.
- Sabroe, I., Prince, L. R., Jones, E. C., Horsburgh, M. J., Foster, S. J., Vogel, S. N., Dower, S. K., Whyte, M. K. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol.* 2003, v.170, p.5268–5275.
- Sahlin, S., Hed, J., Rundquist, I. Differentiation between attached and ingest immune complex by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J. Immunol Meth.* 1983, v.60, p.115-124.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002, v.177, n.1, p.67-80.
- Santos, E.O.L. **Galangina modula o metabolismo oxidativo de neutrófilos interferindo na cooperação dos receptores Fc gama e CD11b/CD18.** Ribeirão Preto, 2014. 143f. Tese. Doutorado em Ciência, Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- Santos, E.O.L. **Mecanismo de ação de flavonoides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc-gama e CR.** 2010. (Mestrado). Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- Santos, E.O.L., Azzolini, A.E.C.S., Lucisano-Valim, Y.M. Optimization of a flow cytometric assay to evaluate the human neutrophil ability to phagocytose immune complexes via Fcγ and complement receptors. *J Pharmac Toxicol Meth.* 2015, v.72, p.67–71.

- Santos, E.O.L., Kabeya, L.M., Figueiredo-Rinhel, A.S.G., Marchi, L. F., Andrade, M.F., Piatesi, F., Paoliello-Paschoalato, A.B., Azzolini, A.E.C.S., Lucisano-Valim, Y.M. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. *Internat Immunopharm.* 2014, v.21, p.102-111.
- Sawaya, A.C., Tomazela, D.M., Cunha, I.B., Bankova, V.S., Marcucci, M.C., Custodio, A.R., Eberlin, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst.* 2004, v.129, p.739-744.
- Schieven, G.L., de Fex, H., Stephenson, L. Hypochlorous acid activates tyrosine phosphorylation signal pathways leading to calcium signaling and TNF α production. *Antioxid Redox Signal.* 2002, v.4, p.501–507.
- Schoonbroodt, S., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Piette, J. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem J.* 1997, v.321, p.777–785.
- Schuller-Levis, G.B., Park, E. Taurine: new implications for an old amino acids. *FEMS Microbiol Lett.* 2003, v.226, p.195-202.
- Schultz, J., Kaminker, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys.* 1962, v.96, p.465–467.
- Schymeinsky, J., Mócsai, A., Walzog, B. Neutrophil activation via β 2 integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost.* 2007, v.98, p.262–73.
- Segal, A.W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A., Miller, R. The respiratory burst of phagocytosis cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature.* 1981, v.290, p.406-409.
- Seger, R., Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995, v.9, p.726-35.
- Selvaraj P, Rosse WF, Silber R, Springer T.A. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature.* 1988, v.333, p.565-7.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol.* 1993, v.150, p.1535–43.
- Sengeløv, H., Nielsen, M.H. Borregaard, N. Separation of human neutrophil plasma membrane from intracellular vesicles containing alkaline phosphatase and NADPH oxidase activity by free flow electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1992, v.267, p.14912-14917.
- Serrander, L., Fallman, M., Stendahl, O. Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signaling leading to phagocytosis in human neutrophils. *Inflammation.* 1996, v.20, n.4, p.439-50.
- Sforcin, J.M. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2007, v.113, p.1-14.

- Sforcin, J.M., Bankova, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011, v.13, n.2, p.253-60.
- Sforcin, J.M., Sousa, J.P.B., Silva Filho, A.A., Bastos, J.K., Bufalo, M.C., Tonuci, L.R.S. ***Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira.*** 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2012.
- Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J., Banerjee, A. Silliman, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation, *J Leukoc Biol.* 2005, v.78, p.1025–1042.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A. et al. A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem.* 2011, v.286, p.4517-24.
- Shiba, Y., Kinoshita, T., Chuman, H. et al. Flavonoides as Substrates and Inhibitors of Myeloperoxidase Molecular Actions of Aglycone and Metabolites. *Chem Res Toxicol.* 2008, v.21, p.1600-1609.
- Shimaoka, M., Takagi, J., Springer, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct.* 2002, v.31, p.485–516.
- Simões, L.M.C., Gregório, L.E., Silva Filho, A.A., Souza, M.L., Azzolini, A.E.C.S., Bastos, J.K., Lucisano-Valim, Y.M. Effect of brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharm.* 2004, v.94, p.59-65.
- Soares, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.* 2002, v.15, p.71-81.
- Soubhye, J., Aldib, I., Elfving, B., Gelbcke, M., Furtmüller, P.G., Podrecca, M. et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of Novel 3-Alkylindole Derivatives as Selective and Highly Potent Myeloperoxidase Inhibitors. *J Med Chem.* 2013, v.56, n.10, p.3943-3958.
- Soubhye, J., Prévost, M., Van Antwerpen, P., Zouaoui Boudjeltia, K., Rousseau, A. Structure-Based Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of 3-(Aminoalkyl)-5-fluoroindoles as Myeloperoxidase Inhibitors. *J Med Chem.* 2010, v.53, p.8747–8759
- Spring, O. Chematoxononmy based on metabolites from glandular trichomes. *Advances in Botanical Research.* 2000, v.31, p.153-174.
- Sroka, Z., Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2003, v.41, p.753–758, 2003.
- Steinberg, S.F. Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological Reviews.* 2008, v.88, n.4, p.1341-1378
- Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *FEBS J.* 2008, v.275, p.3249–3277.

- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J.A, Koenderman, L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.* 2013, v.94, p.595-601.
- Takeda, K., Akira, S. Toll-Like Receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015, v.109, p.14.12.1–14.12.10
- Takeda, K., Takeuchi, O., Akira, S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 2002, v.8, n.6, p.459-63.
- Tan, S-M. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties *Biosci Rep.* 2012, v.32, p.241–269.
- Teixeira, E.W., Negri, G., Meira, R.M.S.A., Message, D., Salatino, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2005, v.2, p.85-92.
- Terao, J., Karasawa, H. Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takawa, K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1973, v.57, p.1204-1205.
- Thornton, B.P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R.C., Ross, G.D. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 1996, v.156, p.1235–1246.
- Thorpe, G.H.G., Kricka, L.J. Enchanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Meth in Enzymol.* 1986, v.133, p.331-353.
- Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA, Thelen M. G-Protein-coupled receptors and Fc γ -receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem.* 1997, v.272, n.44, p. 28096-101.
- Tjelle, T.E., Løvdaal, T., Berg, T. Phagosome dynamics and function. *BioEssays.* 2000,v.22, p.255-263.
- Tosi, M.F., Berger, M. Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J. Immunol.* 1988, v.141,p.2097–2103
- Trott, O., Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry.* 2010, v.31, n.2, p.455-461.
- Tsai, S., Chao, C., Yin, M. Preventive and therapeutic effects of caffeic acid against inflammatory injury in striatum of MPTP-treated mice. *Eur J Pharmacol*, 2011, v.670, p.441–447.
- Tsurubuchi, T., Aratani, Y., Maeda, N., Koyama, H. Retardation of early-onset PMA-induced apoptosis in mouse neutrophils deficient in myeloperoxidase. *J Leukoc Biol.* 2001, v.70, n.1, p.52-8.

- Twentyman, P.R., Luscombe, M. A study of some variable in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*. 1987, v.56, p.279-285.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002, v.20, p.825-52.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999, v.401, n.6755, p.811-5.
- Unkless, J.C, Shen, Z., Lin, C.W., Debeus, E. Function of human FcγRIIA and FcγRIIIB. *Semin Immunol* 1995; v.7, p. 37-44.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2009, v.5, n.10, Article ID e1000639.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microb*. 2006, v.8, n.4, p.668–676.
- van Bruggen, R., Drewniak, A., Jansen M. et al. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol. Immunol.*, 2009, v.47, n.2-3, p.575-581.
- van der Veen, B.S., de Winther, M.P.J., Heeringa, P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and their relevance to human health and disease. *Antioxid & Redox Signal*. 2009, v.11, n.11, p.2899-2937.
- Van Dyke, K., Castranova, V. Cellular chemiluminescence. Boca Raton, 1987, v.1, p.162-192.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Balish, E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect. Immun*. 1996, v.64, p.3127–3133.
- Vorobjeva, N.V., Pinegin, B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2014, v.12, p.1286-96.
- Vossebeld, P.J.M., Homburg, C.H., Roos, D., Verhoeven, A.J. The anti-FcγRIII MAb 3G8 induces neutrophil activation via a cooperative action of FcγRIIIb and FcγRIIa. *Int J Biochem Cell Biol.*, 1997, v.29, n.3, p.465-73.
- Way, K.J., Chou, E., King, G.L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci*. 2000, v.21, p.181–187.
- Weir, D.M. **Immunochemistry and molecular immunology**. 5.ed. Oxford:Blackwell Scientific Publications, 570, 1986.

- Whitlock, B.B., Gardai, S., Fadok, V., Bratton, D., Henson, P.M. Differential roles for α M β 2 integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of Akt and ERK survival mechanisms. *J Cell Biol.* 2000, v.151, n.6, p.1305-20.
- Wickens, A.P. Aging and the free radical theory. *Resp. Physiol.* 2001, v.120, p.379-391.
- Wientjes, F.B., Panayotou, G., Reeves, E., Segal, A.W. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox, *Biochem. J.* 1996, v.317 (Pt 3), p.919–924.
- Wilde, J.I., Watson, S.P. Regulation of phospholipase C γ isoforms in haematopoietic cells—Why one, not the other? *Cellular Signalling.* 2001, v.13, n.10, p.691–701.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000; v.80, n.5, p. 617-53.
- Woeber, K.A., Ingbar, S.H. Metabolism of L-thyroxine by phagocytosing human leukocytes. *The J Clinic Investig.* 1973, v.52, n.8, p.1796-1803.
- Wu, W., Lu, L., Long, Y., Wang, T., Liu, L., Chen, Q., Wang, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure–activity insight. *Food Chemistry.* 2007, v.105, p.107-115.
- Xia, Y., Borland, G., Huang, J., Mizukami, I.F., Petty, H.R., Todd, R.F., Ross, G.D. Function of the lectin domain of Mac-1/Complement Receptor Type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol.* 2002, v.169, p.6417-6426.
- Yamaguchi, S., Kishikawa, N., Ohyama, K., Ohba, Y., Kohno, M., Masuda, T. et al. Evaluation of chemiluminescence reagents for selective detection of reactive oxygen species. *Anal Chim Acta.* 2010, v.665, p.74–78.
- Yang, G.E., Yang, F., Malakhova, M., Kurinov, I. et al. Caffeic Acid Directly Targets ERK1/2 to Attenuate Solar UV-Induced Skin Carcinogenesis. *American Association for Cancer Research.* 2014, v.7, n.10, p.1056-1066.
- Yang, S.W., Jeong, D., Yi, Y.S., Park, J.G., Seo, H., Moh, S.H., Hong, S., Cho, Y. IRAK1/4-Targeted Anti-Inflammatory Action of Caffeic Acid. *Mediators of Inflammation.* 2013, v.2013. Article ID 518183, 12 pages.
- Zakhireh B, Block LH, Root RK. Neutrophil function and host resistance. *Infection.* 1979, v.7, n.2, p.88-98.
- Zarbock, A., Ley, K. Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys.* 2011, v.510, n.2, p.112-119.

-
- Zarembek, K.A., Godowski, P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002, v.168, n.2, p.554-61.
- Zhou, M. J., Poo, H., Todd, R. F., Petty, H. R. Surface-bound immune complexes trigger transmembrane proximity between complement receptor type 3 and the neutrophil's cortical microfilaments. *J Immunol.* 1992, v.148, n.11, p. 3550-3553.
- Zhou, M.J., Brown, E.J. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *JCell Biol.* 1994, v.125, p.1407–1416
- Žilius, M., Ramanauskienė, K., Briedis, V. Release of Propolis Phenolic Acids from Semisolid Formulations and Their Penetration into the Human Skin In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, v.7, Article ID 958717.
- Zipfel, P.F., Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009, v.9, n.10, p.729-40.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Avaliação da interação entre o ácido cafeico e a MPO, por *docking* Validação da análise computacional

A enzima mieloperoxidase (MPO) humana é proteína altamente glicosilada, que detém uma massa molecular aproximada de 150kDa e, consiste num tetrâmero organizado na forma de um dímero de subunidades pesadas α (467 a.a., 57kDa) e leves β (112 a.a., 12kDa), cujo conjunto dessas subunidades proteicas é denominado de protômero pesado-leve. (**Figura 4.22**) As subunidades pesadas estão unidas por ligações de dissulfeto ao longo de seu eixo (Andrews, Krinsky, 1981; Klebanoff, 2005; Malle et al., 2007). Além disso, carboidratos ricos em manoses e dois grupos hemes estão covalentemente ligados as subunidades pesadas (Harrison, Pablan, Schultz, 1997; Olsen, Little, 1984; Atkin, Andersen, Eyre, 1982).

Figura 4.22: Visão geral da MPO humana. As cadeias pesadas representadas em vermelho e laranja, e as cadeias leves em azul e ciano. A proteína apresentada como superfície, sendo os carboidratos dispostos como esferas da mesma cor da cadeia a qual pertencem e, o grupo heme está representado como esferas verdes. (A) Face da proteína na qual há a cavidade de acesso ao sítio ativo; (B) Face inversa. (PDB ID 1CXP).

Todos os dados estruturais disponíveis referem-se a proteína da MPO madura (Fiedler et al., 2000; Blair-Johnson et al., 2001, Forbes et al., 2013) e a maioria dos estudos com inibidores de MPO foram realizados com estes dados. Dessa maneira, neste presente trabalho as estruturas proteicas PDB IDs 4C1M e 1CXP, serão usadas como as referências dos estados ligado e não-ligado da MPO, respectivamente.

O sítio catalítico encontra-se localizado na cavidade que contém o grupo heme (**Figuras 4.23 A-C**). Em 2013, Forbes e colaboradores, co-cristalizaram um inibidor reversível (HX1) revelando que as principais interações, que estabilizam o complexo MPO-HX1, são ligações de hidrogênio com os resíduos His95, Gln91 e Arg239 da enzima, além de

uma interação mediada por água com a cadeia lateral de ácido propiônico e, também interações com o cofator heme através do empilhamento do anel aromático do ligante ao anel pirrol D da estrutura heme (**Figura 2D**).

Figura 4.23: Sítio ativo da mieloperoxidase-MPO. (A) Visão geral, com a proteína representada em superfície cinza com os resíduos do sítio ativo em azul. O cofator heme está representado como esferas amarelas e o inibidor não-covalente HX1 como sticks verdes. (B) Visão lateral da cavidade do sítio ativo através de um “corte” na proteína. O grupo heme e o inibidor HX1 podem ser vistos dentro de uma cavidade, cujo volume se destaca em cinza mais escuro. A abertura da cavidade para o meio externo está na diagonal superior direita, onde pode ser vista a superfície da proteína em cinza mais claro. (C) Entrada do sítio ativo. (D) Interações importantes para a estabilização da interação HX1-MPO. As ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas tracejadas. HX1 faz ligações de hidrogênio com os resíduos His-95, Gln-91 e Arg-239 e interações hidrofóbicas com Phe através de seu anel aromático com substituintes halogenados. O inibidor está representado como sticks com carbonos em verde, heme como sticks com carbono em verde, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e flúor estão em vermelho, azul, branco e azul claro, respectivamente.

Para validação das análises computacionais dos complexos experimentais, é desejável que fazem parte do estudo ligante(s) pertencentes a mesma classe química para a reprodução dos complexos com o receptor (MPO) ou, na pior das hipóteses, seja reveladas as principais interações entre o ligante-receptor.

No estudo da interação de compostos com a enzima mieloperoxidase (MPO), apenas há na literatura, com a deposição dos resultados experimentais em banco de dados- PDB ID 4C1M, a formação do complexo não-covalente com um ácido hidroxâmico (HX1) (Forbes et

al., 2013). No entanto, na literatura há informações sobre docking com a quercetina (flavonóide) (Shiba et al., 2008) e evidências de interação direta com o ácido cafeico (derivado cinâmico) e ácido gálico (derivado benzoico) (Franck et al., 2013). Desse modo, foram utilizadas na validação como controles positivos na interação ligante-receptor, as seguintes moléculas: SHA, HX1, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico (**Figura 4.24**)

Figura 4.24: Substâncias utilizadas como controle positivo de interação com a enzima MPO (PDB ID 4C1M). (A) SHA; CID:66644; (B) HX1; CID:71777699, (C) Quercetina; CID:5280343 (D) ácido cafeico; CID:689043 (E) ácido gálico; CID:370. Abreviaturas: SHA: Ácido salicil-hidroxâmico; HX1: 2-[[3,5-bis (trifluorometil) benzil] amino}-N-hidroxi-6-oxo-1,6-di-hidropirimidina-5-carboxamido; CID: PubChem Coumpound Identifier

Quando complexada a molécula HX1 com a enzima, a melhor pose obtida na análise *in silico* coincide com a experimentalmente observada na co-cristalização (**Figura 4.25 B**), havendo o emparelhamento dos anéis e as mesmas interações descritas na figura 4.23D.

Figura 4.25: Complexo HX1-MPO (A) Pose obtida no docking na formação do complexo HX1-MPO. **(B)** Pose obtida no docking, em sticks totalmente magenta, comparada com a estrutura experimental da co-cristalização do ligante, totalmente em laranja. A orientação experimental foi adequadamente reproduzida. Grupo heme como sticks com carbono em amarelo, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e flúor estão em vermelho, azul, branco e azul claro, respectivamente.

Na construção do complexo SHA-MPO, observou-se o emparelhamento dos anéis e as ligações de hidrogênio com resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239, as mesmas que o HX1 estabelece no sítio ativo (**Figura 4.26 A**). Além disso, nota-se que a pose da molécula SHA se assemelha ao HX1, cujo resultado era de ser esperado, uma vez que, a estrutura química da SHA é semelhante com uma porção da estrutura do HX1.

Figura 4.26: Complexo SHA-MPO (A) Pose obtida no docking na formação do complexo ácido salicílic-hidroxiâmico (SHA – sticks em verde) com a enzima. **(B)** Comparação entre a pose obtida para o SHA, em ciano, e a pose obtida para o HX1, em magenta. Note a coincidência do anel e de suas cadeias laterais entre as substâncias. Grupo heme como sticks com carbono em amarelo, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio estão em vermelho, azul, branco, respectivamente.

Na formação do complexo da quercetina com a MPO observou-se, em ambas as poses obtidas, que as hidroxilas do anel B da estrutura são orientadas ao grupo heme da enzima, havendo também o emparelhamento deste mesmo anel com o anel pirrol D (**Figura 4.27 A-B**), tendo esses resultados em concordância aos docking de Shiba et al. (2008). Quando analisados em conjunto os ligantes quercetina e SHA, revelou-se que o anel B da quercetina não se sobrepõem ao anel do SHA ou HX1 (**Figura 4.27 C**). Desse modo, a quercetina demonstra interagir mais profundamente no sítio ativo da enzima, além de deter um melhor empilhamento dos anéis (do ligante e do receptor), em comparação ao empilhamento do SHA ou HX1.

Figura 4.27: Complexo Quercetina-MPO (A) Pose obtida no docking na formação do complexo quercetina com a enzima. (B) Outra pose obtida para a quercetina, com uma rotação de 180° do anel B em relação a anteriormente descrita. (C) Comparação da primeira pose, em verde, com a pose do HX1, em magenta. Note que a ausência da sobreposição dos anéis das entre as substâncias. Grupo heme como sticks com carbono em amarelo, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio estão em vermelho, azul, branco, respectivamente.

As poses obtidas com ácido cafeico apontam que o composto estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239 (**Figuras 4.28 A-C**). Já as poses obtidas com o ácido gálico, demonstraram ligações com os mesmos resíduos anteriormente citados (**Figuras 4.28 D-E**).

Do mesmo modo que a quercetina, as poses obtidas no docking para o ácido cafeico (derivado cinâmico) e o ácido gálico (derivado benzoico) concordam quanto a orientação das hidroxilas do anel voltadas ao grupo heme da enzima (**Figura 4.29**).

Esses resultados anteriores aqui descritos são obtidos tanto restringindo o docking somente ao sítio ativo, quanto permitindo que os ligantes interajam com qualquer parte da proteína toda, o que é uma situação mais desafiadora. Os resultados indicam que o método de docking está validado adequadamente e pronto para avaliar a interação de outras moléculas com o sítio ativo da MPO para as quais não há informação experimental prévia.

Figura 4.28: Complexo de ligação do ácido cafeico ou ácido gálico com a MPO. (A,B) Poses obtidas pelo derivado cinâmico (ácido cafeico). (C, D) Poses obtidas pelo derivado benzoico (ácido gálico). (E) Modo de interação obtido para o ácido gálico, note as ligações de hidrogênio estabelecidas simultaneamente com Gln-91, His-95, Arg-239. Grupo heme como sticks com carbono em verde, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio estão em vermelho, azul, branco, respectivamente.

Figura 4.29: Comparação das poses obtidas para quercetina, ácido cafeico e ácido gálico. (A) As poses obtidas pela quercetina (verde), ácido cafeico (azul) e ácido gálico (vermelho), concordam na orientação das hidroxilas do anel benzoico voltadas ao grupo heme. Note a sobreposição dos anéis das substâncias e o emparelhamento com anel do grupo heme. (B) Sobreposição de todas as poses relevantes. Grupo heme como sticks com carbono em amarelo, resíduos da proteína como sticks com carbono em cinza e ferro como uma esfera laranja. Oxigênio, nitrogênio, hidrogênio estão em vermelho, azul, branco, respectivamente.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP

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

Of. CEP/FCFRP nº. 009/2014
kms

Ribeirão Preto, 18 de março de 2014.

À
Prof^a. Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim
Depto. de Física e Química
FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “MODULAÇÃO DAS FUNÇÕES EFETORAS DE NEUTRÓFILOS POR BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA ESTIMULADOS POR IMUNOCOMPLEXOS E PMA”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 331 foi analisado e aprovado *ad referendum* do CEP em 18/03/2014.

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

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

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO 2 – Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 05.1.1050.53.9), intitulado: "Estudo do Mecanismo de Ação de Cumarinas sobre Funções Efetoras de Neutrófilos Estimulados por Imunocomplexos", de autoria de **Yara Maria Lucisano Valim**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 08.11.05

Ribeirão Preto, 8 de novembro de 2005

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro