UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo do efeito imunomodulador do derivado 3-
fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-
cumarina em neutrófilos humanos estimulados e em modelo
animal de inflamação induzida por zimosan**

Micássio Fernandes de Andrade

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do efeito imunomodulador do derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina em neutrófilos humanos estimulados e em modelo animal de inflamação induzida por zimosan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aluno: Micássio Fernandes de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano-Valim

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrade, Micássio Fernandes de

Estudo do efeito imunomodulador do derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina em neutrófilos humanos estimulados e em modelo animal de inflamação induzida por zimosan. Ribeirão Preto, 2016.

173 p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

ANDRADE, M. F. **Estudo do efeito imunomodulador do derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina em neutrófilos humanos estimulados e em modelo animal de inflamação induzida por zimosan.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Profa Dra. Yara Maria Lucisano Valim, pela orientação na realização deste trabalho e contribuição para o meu crescimento científico e intelectual.

À farmacêutica-bioquímica Ana Elisa C. S. Azzolini, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos professores Dr. Flavio da Silva Emery e Dra. Mônica Tallarico Pupo da FCFRP-USP, pela síntese do Derivado 3-fenilcumarínico estudado.

Aos professores Dra. Lúcia Helena Faccioli, Dra Renata Fonseca Vianna Lopez e Dr. Sérgio A. Uyemura, por colocarem à disposição equipamentos dos seus laboratórios para a realização de alguns experimentos.

À Dra. Luciana Mariko Kabeya, pelos ensinamentos minuciosos no trabalho com produtos naturais e sintéticos, pela ajuda na escrita de manuscritos científicos e pela contribuição para o meu crescimento científico e intelectual.

À Dra. Ana Paula Landi Librandi, pela orientação na realização dos lipossomas e pela contribuição para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Ms. Leandro Oliveira Bortot, pela avaliação da interação do Derivado 3-fenilcumarínico com o sítio ativo da mieloperoxidase por meio de *docking*.

Aos Dr. Everton O. L. dos Santos e Dra. Andréa S. G. Figueiredo-Rinhel, pela ajuda na realização de alguns experimentos, pelo apoio científico e intelectual, momentos de reflexão e discussão dos experimentos.

À Ms. Camila A. Carvalho, pela ajuda nos experimentos de padronização das condições de cultura celular.

Aos amigos do grupo de pesquisa Dra. Adriana B. P. Paschoalato, Dra Juliana E. T. Kawahisa, Ms. Lamartine L. Melo, Dra. Larissa F. Marchi e mestrandas Lucinéia R. Albiero, pela amizade, apoio científico e intelectual, momentos de reflexão e discussão dos experimentos.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Alcides S. Pereira e Nadir Mazzucato, pelo auxílio técnico na realização dos experimentos e convivência agradável.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP Ana Cristine Ferreira, pela atenção e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 2012/23541-4).

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram”.

Charles Darwin.

RESUMO

ANDRADE, M. F. **Estudo do efeito imunomodulador do derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina em neutrófilos humanos estimulados e em modelo animal de inflamação induzida por zimosan.** Tese. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016. 155f.

Os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes. Apesar de serem importantes no combate às infecções, o intenso recrutamento e a consequente ativação dessas células levam à liberação de mediadores inflamatórios que estão relacionados com o agravamento do quadro clínico de inúmeras doenças. Dessa forma, nos últimos anos tem-se intensificado a procura por substâncias terapêuticas que minimizem os danos teciduais ocasionados pela infiltração neutrofílica. Estudos prévios do grupo de pesquisa mostraram que as 3-fenilcumarinas, que constituem uma classe de produtos naturais de origem vegetal, são substâncias promissoras como moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Em continuidade a essas investigações, o derivado sintético 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) foi selecionado, por apresentar o grupo substituinte orto-diidroxi nas posições C-6 e C-7 do esqueleto cumarínico e a metilenodioxila ligada ao anel fenílico, no intuito de avaliar o seu efeito nas demais funções efetoras dos neutrófilos, como também em um modelo animal de inflamação articular. Foi avaliado o efeito modulatório *in vitro* da C13 sobre a quimiotaxia, a produção de ERO e interação com o sítio ativo da mieloperoxidase (MPO), a fagocitose de imunocomplexos (IC), a desgranulação da enzima elastase, a atividade microbicida sobre *Candida albicans*, a mobilização e o influxo de cálcio, a polimerização do citoesqueleto, e a formação e liberação das NETs em neutrófilos humanos. A C13 inibiu, de forma dependente da concentração, o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores de IgG (FcγR) e/ou de complemento (CR), utilizando-se diferentes tipos de IC e foi capaz de interagir com o sítio ativo da MPO. Nas concentrações próximas da necessária para inibir 50% do metabolismo oxidativo (~ 2 μmol/L), a C13 não interferiu nas demais funções efetoras dos neutrófilos avaliadas. No entanto, na maior concentração avaliada (20 μmol/L), a C13 inibiu cerca de: 30% da capacidade das células de migrar a favor dos agentes quimiotáticos *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e leucotrieno B₄; 70% da fagocitose de IC mediada por CR; 40% e 80% da desgranulação estimulada por fMLP e IC imobilizados, respectivamente; 50% do processo de formação e liberação das NETs. Esta concentração de C13 também interferiu na polimerização do citoesqueleto de actina, mas não inibiu: a quimiotaxia de neutrófilos frente à interleucina (IL) 8; a capacidade fagocítica de IC estimulada via FcγR e FcγR+CR; e a atividade microbicida sobre *C. albicans*. Na segunda parte deste trabalho, foi avaliada a toxicidade da C13 sobre neutrófilos mantidos em condições de cultura celular por 6 e 12 h. Nos períodos avaliados, essa substância não alterou a viabilidade dos neutrófilos. Por último, a C13 foi incorporada em vesículas lipossomais e sua atividade biológica foi avaliada em ratos Wistar com inflamação articular induzida por zimosan. O tratamento dos animais com a C13 lipossomal (1mg/Kg) reduziu a formação do edema e a infiltração de leucócitos e neutrófilos na sinóvia inflamada, mas não alterou a concentração sinovial das citocinas inflamatórias fator de necrose tumoral α, IL-1β e IL-6. Portanto, o derivado 3-fenilcumarínico C13 pode servir de protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com aplicação no tratamento de doenças onde há intensa participação dos neutrófilos.

Palavras-chave: Neutrófilo, 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina, função efetora, atividade anti-inflamatória, lipossoma, artrite.

ABSTRACT

ANDRADE, M. F. **Study of the immunomodulator effect of the 3-phenylcoumarin derivative 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin in stimulated human neutrophils and in an animal model of zymosan-induced inflammation.** Tese. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016. 155f.

Neutrophils are the most abundant circulating leukocytes. Although neutrophils are important to fight against infections, the massive recruitment and consequent activation of these cells result in the release of inflammatory mediators that are associated with worsening of the clinical condition in many diseases. In this sense, the search for new therapeutic compounds that minimize tissue damage caused by neutrophil infiltration has been intensified in the past few years. Previous studies have demonstrated that 3-phenylcoumarins, a class of plant-derived natural compounds, are promising modulators of neutrophil oxidative metabolism. To continue these investigations, we selected the 3-phenylcoumarin derivative 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin (C13), bearing the 6,7-dihydroxyl and the 3',4'-methylenedioxy groups, to further assess its effects on the other effector functions of neutrophils, as well as on in an animal model of articular inflammation. We examined the *in vitro* modulator effect of C13 on the human neutrophil chemotaxis, production of ROS and interaction with active site of myeloperoxidase (MPO), phagocytosis of immune complexes (IC), degranulation, killing of *Candida albicans*, calcium mobilization and influx, cytoskeleton polymerization, and the formation and release of NETs. C13 inhibited, in a concentration-dependent manner, the neutrophil ROS generation elicited via IgG (FcγR) and/or complement (CR) receptors using different types of IC and it interacted with active site of MPO. At concentrations near to that required to suppress the ROS production by 50% (~2 μmol/L), C13 did not modulate the other neutrophil effector functions assessed. However, at the highest concentration tested (20 μmol/L), C13 inhibited nearly: 30% of the cell ability to migrate towards *n*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and leukotriene B₄; 70% of CR-mediated phagocytosis of IC; 40% and 80% of cell degranulation triggered by fMLP and immobilized IC, respectively; and 50% of the NETs formation and release process. Such C13 concentration also interfered in the actin cytoskeleton polymerization, but it did not suppress the neutrophil: chemotaxis towards interleukin (IL) 8; capacity to phagocytose IC elicited via FcγR and FcγR+CR; and killing of *C. albicans*. In the second part of this study, we examined whether C13 was toxic towards neutrophils maintained in culture for 6 and 12 h. At the time points assessed, this compound did not change the viability of neutrophils. Finally, we incorporated C13 into liposomes and examined its biological activity in Wistar rats of zymosan-induced articular inflammation. Treatment of animals with liposomal C13 reduced edema formation, and leukocyte and neutrophil infiltration in the inflamed synovia, but it did not change the synovial concentration of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor α, IL-1β, and IL-6. Therefore, the 3-phenylcoumarin derivative C13 can be a prototype for the development of novel therapeutic agents to be used in the treatment of diseases where neutrophils have intense participation.

Keywords: neutrophil, phenylcoumarin, 6,7-dihydroxy-3-[3',4'-methylenedioxyphenyl]-coumarin, effector function, anti-inflammatory activity, liposome, arthritis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
AIA	artrite induzida por adjuvante
AR	Artrite Reumatóide
ATP	adenosina tri-fosfato
BLT1	receptor para o leucotrieno B ₄
BTP	3,5-bis trifluorometil pirazol
CAT	catalase
C3b, C3bi	fragmentos de ativação do sistema complemento
CFD	diluyente de fixação do complemento
CHOL	colesterol (do inglês “cholesterol”)
CI ⁵⁰	concentração que inibe 50% da resposta biológica
CONEP	comissão nacional de ética em pesquisa com seres humanos
c.p.m.	contagem de fótons por minuto
CR	receptor de complemento
CR1, CR2, CR3 e CR4	receptores de complemento tipo 1, 2, 3 e 4
DAF	fator acelerador de decaimento
DAG	diacilglicerol
DEAE	dietilaminoetil
DGC	doença granulomatosa crônica
DMARDs	drogas anti-reumáticas capazes de modificar a doença (do inglês, Disease-modifying antirheumatic drugs)
DMSO	dimetilsulfóxido
DPI	difenileno-iodônio
ELISA	Imunoensaio enzimático (do inglês, enzyme linked immuno sorbent assay)
ERO	espécies reativas de oxigênio
F(ab') ₂	fragmento de reconhecimento do antígeno da molécula de anticorpo

FAD	flavina adenina dinucleotídeo
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
FcγR	receptor para a porção Fc de IgG
FcγRIIa, FcγRIIb	isoformas de receptores Fcγ
FIPI	5-fluoro-2-indolil des-clorohalopemida
FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G (do inglês, G protein-coupled receptor)
GPI	glicosil fosfatidilinositol
HBSS	Solução balanceada de Hank's (do inglês, Hank's balanced salt solution)
HRP	<i>horseradish</i> peroxidase
IC	imunocomplexo (s)
IC IgG-OVA	imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina
IC IgG-OVA/SHN	imunocomplexo de ovoalbumina e IgG anti-ovoalbumina, opsonizado com soro humano normal
IC F(ab') ₂ -OVA/SHN	imunocomplexo de ovoalbumina e porção de ligação ao antígeno, opsonizado com soro humano normal
IC ₅₀	concentração que inibe 50% da resposta biológica
ICAM	molécula de adesão intercelular
IgG	imunoglobulina da classe G
IL-1β	interleucina 1β
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
ITAM	imunorreceptor com motivo de ativação baseado em tirosina
ITIM	imunorreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina
LFA-1	antígeno 1 associado a função linfocitária
LDH	lactato desidrogenase
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LUV	large unilamellar vesicles, da sigla em inglês
M.M.	massa molecular

MPO	mieloperoxidase
m/v	massa/volume
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NETs	Redes extracelulares de neutrófilos (do inglês, neutrophil extracellular traps)
n-fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
NF- κ B	fator nuclear de transcrição κ B
NSAIDs	drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (do inglês, nonsteroidal anti-inflammatory drug)
OVA	ovalbumina
PICD	Morte celular induzida por fagocitose (do inglês, phagocytosis-induced cell death)
PI3-K	fosfatidilinositol 3-kinase
PMA	acetato miristato de forbol (do inglês, phorbol 12-myristate 13-acetate)
PSGL-1	ligante 1 da glicoproteína P-selectina
PtdInsP	fosfatidilinositol
PtdInsP2	fosfatidilinositol bi-fosfato
PtdInsP3	fosfatidilinositol tri-fosfato
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, da sigla em inglês
p22 ^{phox} , p40 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox}	proteínas de 22, 40, 47 e 67 kDa, componentes do complexo da NADPH oxidase
pAB	<i>p</i> -aminobenzohidrazida
PAF	Receptor ativador de plaquetas (do inglês, platelet-activating factor)
phox	oxidase de fagócitos
PMA	acetato de miristoilforbol
QL	quimioluminescência
QLluc	quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	quimioluminescência dependente de luminol
QSAR-2D	Relação quantitativa estrutura-atividade bidimensional (do inglês, quantitative structure–activity relationship)
QSAR-3D	Relação quantitativa estrutura-atividade tridimensional (do inglês, quantitative structure–activity relationship)
QUER	quercetina

R _F	fator de retardamento
T _H 2	células T helper do padrão de resposta 2
SBF	soro bovino fetal
S/d	sem diluir; não diluído
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLPI	inibidor de protease secretória de leucócitos
SOCE	canais de cálcio operados pelo estoque (do inglês, store-operated calcium entry)
SOD	superóxido dismutase
Src	família de proteínas tirosinas quinases
SAAVNA	<i>succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida</i>
STIM1	Stromal interaction molecule 1
TNF α	fator de necrose tumoral tipo α
UC	ultracentrifugação
v/v	volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema simplificado da ativação dos neutrófilos e produção das espécies reativas de oxigênio	13
Figura 1.2	Representação esquemática dos fatores envolvidos na compensação de carga através da membrana fagossomal e a liberação da enzima elastase dos grânulos	15
Figura 1.3	Sinergismo de receptores durante o processo de fagocitose e as diferentes formas de polimerização do citoesqueleto de actina	19
Figura 1.4	Núcleo fundamental dos derivados 3-fenilcumarínicos	22
Figura 3.1	Estrutura química do derivado 3-fenilcumarínico (C13)	29
Figura 3.2	Representação das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade do derivado 3-fenilcumarínico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.	35
Figura 4.1	Quimioluminescência dependente de luminol (QLum) e de lucigenina (QLuc) de neutrófilos humanos estimulados via Fcγ ₁ por meio de IC precipitado formado de IgG-OVA	51
Figura 4.2	Quimioluminescência dependente de luminol (QLum) e de lucigenina (QLuc) de neutrófilos humanos estimulados via Fcγ ₁ e CR3 por meio de IC precipitado formado de IgG-OVA opsonizado com SHN	52
Figura 4.3	Quimioluminescência dependente de luminol (QLum) e de lucigenina (QLuc) de neutrófilos humanos estimulados via CR3 por meio de IC precipitado formado de F(ab') ₂ -OVA opsonizado com SHN	53
Figura 4.4	Quimioluminescência dependente de luminol (QLum) e de lucigenina (QLuc) de neutrófilos humanos estimulados com PMA	54
Figura 4.5	Avaliação da interação do derivado 3 fenilcumarínico com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase humana (MPO) por meio de <i>docking</i>	56

Figura 4.6	Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA - (OVA marcada com FITC)	58
Figura 4.7	Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA/SHN - (OVA marcada com FITC)	59
Figura 4.8	Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de F(ab') ₂ -OVA/SHN - (OVA marcada com FITC).	60
Figura 4.9	Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a expressão do receptor CD11b/CD18, na forma total e ativa, na membrana de neutrófilos humanos	63
Figura 4.10	Desgranulação de neutrófilos, estimulados com fMLP, por meio da análise da atividade da enzima elastase liberada.	65
Figura 4.11	Desgranulação de neutrófilos, estimulados com fMLP, por meio da análise da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos	67
Figura 4.12	Atividade da enzima elastase, isolada previamente, de neutrófilos humanos estimulados com fMLP	69
Figura 4.13	Atividade Microbicida de neutrófilos humanos:	71
Figura 4.14	Mobilização e Influxo de Ca ²⁺ de neutrófilos humanos estimulados com fMLP:	73
Figura 4.15	Mobilização e Influxo de Ca ²⁺ de neutrófilos humanos estimulados com IC	74
Figura 4.16	Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados	76
Figura 4.17	Quantificação da Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados	77
Figura 4.18	Formação e liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos humanos (NETs)	79
Figura 4.19	Quantificação da liberação de DNA de neutrófilos humanos estimulados	80
Figura 4.20	Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular	82
Figura 4.21	Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular	83

Figura 4.22	Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular na presença do derivado 3-fenilcumarínico C13	84
Figura 4.23	Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a expressão dos receptores CD62L, CD64 e CD16 de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular	85
Figura 4.24	Recrutamento <i>in vitro</i> de neutrófilos humanos por meio de câmara de Boyden	87
Figura 4.25	Expressão dos receptores quimiotáticos BLT1 e FLRP1 de neutrófilos humanos	89
Figura 4.26	Variação no diâmetro das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos:	91
Figura 4.27	Migração de leucócitos totais e neutrófilos no líquido sinovial das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos:	92
Figura 4.28	Concentração das citocinas inflamatórias TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 no líquido sinovial das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Inibição da QLlum e da QLluc pelo derivado 3-fenilcumarínico C13, representado pelo valor de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$), para neutrófilos humanos estimulados com diferentes tipos de imunocomplexos precipitados e também com o estímulo solúvel PMA.	55
------------	---	-----------

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características gerais dos neutrófilos	2
1.2. Fatores que regulam a sobrevivência e a eliminação dos neutrófilos da circulação sanguínea	3
1.3. Quimiotaxia	5
1.4. Receptores dependentes de opsonização	6
1.4.1. Receptores Fcγ	6
1.4.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento	7
1.5. Fagocitose	8
1.6. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	9
1.6.1. NADPH oxidase	10
1.6.2. Mieloperoxidase	11
1.7. Grânulos: produção e liberação	13
1.7.1. Desgranulação da enzima elastase	14
1.8. NETs: formação e liberação	15
1.9. Mobilização e influxo de cálcio em Neutrófilos	16
1.10. Polimerização do Citoesqueleto de Actina de Neutrófilos	18
1.11. Participação dos neutrófilos em doenças mediadas pela deposição de imunocomplexos	20
1.12. Derivados 3-fenilcumarínicos	21
1.13. Incorporação de compostos fenólicos em lipossomas e o tratamento de doenças mediadas pela deposição de imunocomplexos	23
1.14. Modelo animal de artrite e tratamento com produtos naturais	24
2. OBJETIVOS	26
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	28
3.1. Reagentes	29

	XX
3.2. Síntese do derivado 3-fenilcumarínico utilizado no estudo	29
3.3. Preparação dos estímulos	30
3.3.1. Preparação do fragmento F(ab') ₂ a partir da molécula de IgG	30
3.3.2. Preparação dos Imunocomplexos precipitados (IC)	30
3.3.3. Opsonização dos Imunocomplexos precipitados (IC)	30
3.3.4. Preparo dos estímulos fMLP, PMA, IL-8 e LTB ₄	31
3.4. Sujeitos da pesquisa	31
3.4.1. Aspectos éticos	31
3.4.2. Obtenção do material biológico	31
3.4.2.1. Obtenção dos neutrófilos	31
3.4.2.1.1. Obtenção dos neutrófilos através do Método da Gelatina:	32
3.4.2.1.2. Obtenção dos neutrófilos através do Método Ficol-Histopaque:	32
3.4.2.1.3. Obtenção dos neutrófilos através do Método do Monopólio:	32
3.5. Avaliação do efeito de derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, estimulados via receptores Fc, por meio de Imunocomplexos Precipitados formados de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, e F(ab') ₂ -OVA/SHN; e Imunocomplexos Aderidos formados de IgG-OVA; além do estímulo solúvel PMA:	33
3.5.1. Preparo de Placas de 96 poços, próprias para leitura de Quimioluminescência (QL), com Imunocomplexos Aderidos formados de IgG-OVA:	33
3.5.2. Quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina de neutrófilos humanos estimulados:	33
3.6. Avaliação da interação entre o derivado 3-fenilcumarínico C13 e a enzima mieloperoxidase humana (MPO) por <i>docking</i> :	35
3.7. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de fagocitose de Imunocomplexos (IC) por neutrófilos humanos:	36
3.7.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a Expressão do receptor de adesão e ativação celular (CD11b/CD18) de neutrófilos humanos:	36
3.8. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de desgranulação de neutrófilos humanos estimulados com fMLP e Imunocomplexo (IC) aderido:	37
3.8.1. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com fMLP após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico:	37
3.8.2. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com Imunocomplexo Aderido após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico:	37

3.8.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade da enzima elastase previamente isolada de neutrófilos humanos:	38
3.9. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a atividade microbicida de neutrófilos humanos na presença de <i>Candida albicans</i> :	39
3.10. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o influxo e a mobilização de cálcio de neutrófilos humanos estimulados com fMLP e IC precipitado formado de IgG-OVA:	39
3.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados com fMLP:	40
3.11.1. Análise qualitativa da polimerização do Citoesqueleto por meio de Microscopia Confocal:	40
3.12. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de formação de Redes extracelulares de Neutrófilos (NETs):	41
3.12.1. Análise qualitativa da formação e liberação das NET por meio de Microscopia Confocal:	41
3.12.2. Análise quantitativa da formação e liberação das NET:	42
3.13. Investigação do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre neutrófilos humanos	42
3.13.1. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo	42
3.13.2. Análise da alteração do conteúdo de DNA	43
3.13.3. Análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)	43
3.13.4. Análise da expressão dos receptores de membrana CD62L e CD16, relacionados com o nível de ativação celular de neutrófilos	44
3.14. Avaliação do potencial efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i> :	44
3.14.1. Recrutamento <i>in vitro</i> de neutrófilos humanos, na presença do derivado 3-fenilcumarínico C13, por meio de câmara de Boyden:	44
3.14.2. Expressão de receptores de recrutamento (CXCR1, CXCR2, BLT1 e FLRP1) de neutrófilos humanos incubados com o derivado 3-fenilcumarínico C13:	45
3.15. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos:	45
3.15.1. Preparo dos lipossomas e caracterização físico-química das vesículas	45
3.15.2. Incorporação do derivado 3-fenilcumarínico C13 nas vesículas lipossomais:	46

3.15.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, estimulados via receptores Fc γ utilizando Imunocomplexo precipitado formado de IgG-OVA:	46
3.16. Avaliação do derivado 3-fenilcumarínico C13, incorporado em lipossomas, em Modelo animal de Artrite induzida por zimosan:	46
3.16.1. Animais utilizados no estudo:	46
3.16.2. Procedimentos éticos:	47
3.16.3. Tratamento dos animais:	47
3.16.4. Indução local da artrite:	47
3.16.5. Parâmetros inflamatórios avaliados:	47
3.17. Análise de dados	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fc γ e/ou CR, utilizando diferentes tipos de IC precipitados formados de: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab') ₂ -OVA/SHN, e também o estímulo solúvel PMA.	50
4.2. Análise da interação do derivado 3-fenilcumarínico C13 com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase (MPO) através de <i>docking</i> :	55
4.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na fagocitose, de diferentes tipos de Imunocomplexos precipitados, por neutrófilos humanos:	57
4.3.1. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na expressão dos receptores CD11b/CD18 (CR3 ou Mac1) na membrana celular de neutrófilos humanos:	62
4.4. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a desgranulação e a atividade da enzima elastase de neutrófilos humanos:	64
4.4.1. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com fMLP após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico C13:	64
4.4.2. Atividade da elastase liberada de neutrófilos, estimulados com Imunocomplexo Aderido formado de IgG-OVA, após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico C13:	66
4.4.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade da enzima elastase isolada:	68
4.5. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade microbicida de neutrófilos humanos:	70
4.6. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Mobilização e no Influxo de Cálcio de neutrófilos humanos estimulados:	72
4.7. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Polimerização do Citoesqueleto de actina de neutrófilos humanos estimulados:	75

4.7.1. Análise qualitativa da Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos por meio de Microscopia Confocal:	75
4.8. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Formação e Liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs):	78
4.8.1. Análise qualitativa da formação e liberação de NETs de neutrófilos humanos por meio de Microscopia Confocal:	78
4.8.2. Análise quantitativa da formação e liberação de NETs de neutrófilos humanos:	80
4.9. Investigação do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico C13 em neutrófilos humanos mantidos sob condições de cultura celular	81
4.9.1. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo	81
4.9.2. Análise da porcentagem de Hipodiploidia, utilizando iodeto de propídio (PI) como marcador, em citometria de fluxo	82
4.9.3. Análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)	83
4.9.4. Análise da expressão dos receptores de membrana celular CD62L e CD16 de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular, utilizando citometria de fluxo	84
4.10. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 no recrutamento <i>in vitro</i> de neutrófilos humanos por meio de câmara de Boyden:	85
4.10.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na expressão dos receptores de recrutamento (BLT1 e FLRP1) de neutrófilos humanos:	88
4.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 em Modelo Animal de Artrite induzida por zimosan:	90
4.11.1. Avaliação do processo inflamatório na articulação de ratos Wistar com artrite induzida por zimosan:	90
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICES	136
ANEXOS	146

I. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais dos neutrófilos

Os neutrófilos são fagócitos profissionais que compreende de 50 a 70% dos leucócitos circulantes em humanos. Eles são os primeiros leucócitos a migrarem para o foco da inflamação, sendo, portanto células essenciais numa resposta inflamatória aguda, sendo capazes de eliminar os agentes infecciosos por meio de vários mecanismos (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Essas células possuem duas características importantes: apresentam o núcleo segmentado, de onde provém chamá-los de polimorfonucleares e são coradas com o uso de corantes neutros, de onde condiciona chamá-los de neutrófilos (Amulic *et al.*, 2012). Na circulação elas possuem tamanho entre 7–10 μm e o citoplasma rico em grânulos e vesículas secretórias (Borregaard, 2010).

Os neutrófilos possuem um arcabouço de mecanismos úteis na eliminação de um agente infeccioso. Após o recrutamento dessas células até o foco inflamatório elas realizam funções efectoras como, fagocitose de partículas ou agentes infecciosos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), liberação do conteúdo microbicida dos seus grânulos citoplasmáticos no fagolisossoma formado, culminando com atividade microbicida e a eliminação do patógeno (Nauseef, 2007; Strydom e Rankin, 2013).

No início desse século, foi observado que além das funções clássicas já descritas para os neutrófilos, essas células são capazes de controlar um agente infeccioso por meio de outros mecanismos. A liberação de redes extracelulares de material genético, as já conhecidas NETs, que são constituídas de DNA associado às histonas e enzimas dos grânulos citoplasmáticos, como a elastase e a mieloperoxidase, são processos importantes para que o neutrófilo evite a disseminação de um patógeno na corrente sanguínea, como também o elimine e restabeleça as condições de homeostase do indivíduo (Kruger *et al.*, 2015; Leliefeld *et al.*, 2016).

Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais mais sofisticadas e o avanço da ciência, novos conhecimentos acerca dos neutrófilos estão sendo acrescentados ao arcabouço de possibilidades que essas células são capazes de realizar. Sabe-se, por exemplo, que eles são capazes de modular as funções de outras células do sistema imunológico. Por meio da produção de citocinas e quimiocinas, essas células modulam a maturação de células dendríticas; a diferenciação, a proliferação e a ativação de células T; a sobrevivência e proliferação de células B; o aumento da produção de citocinas por células NK; a ativação de macrófagos e a clivagem do receptor da citocina IL-6 o que possibilita a sinalização transcelular (Borregaard, 2010; Kolaczkowska e Kubes, 2013; Wright, Moots e Edwards,

2014). Além disso, em algumas situações inflamatórias como na sinóvia de pacientes com Artrite Reumatóide, elas são capazes de apresentar em suas membranas plasmáticas a molécula de MHC de classe II o que a torna apresentadora de antígeno profissional (Cross *et al.*, 2003).

1.2. Fatores que regulam a sobrevivência e a eliminação dos neutrófilos da circulação sanguínea

Os neutrófilos são produzidos e diferenciados na medula óssea, envolvendo um processo de proliferação e diferenciação celular denominado granulopoiese. Após estarem diferenciados, eles permanecem na medula por cerca de 4 a 6 dias, quando são mobilizados para a circulação em resposta a episódios de inflamação ou infecção (Strydom e Rankin, 2013). Eles possuem vida curta. Após serem liberados da medula óssea essas células duram de 6 a 7 horas na corrente sanguínea, apesar de pesquisas recentes mostrarem que neutrófilos humanos podem viver cerca de cinco dias na circulação (Pillay *et al.*, 2010).

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é o principal agente regulador do ciclo de vida dos neutrófilos. A manutenção do número dessas células na circulação é controlada por esse fator à medida que neutrófilos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos, num processo denominado eferocitose. A eferocitose possibilita a redução da síntese e liberação da citocina IL-23 por macrófagos residentes e células dendríticas que fagocitam os neutrófilos apoptóticos. Por sua vez, o decréscimo de IL-23 interfere na síntese da citocina IL-17 por células T, reduzindo a produção de G-CSF (Stark *et al.*, 2005; Ley, Smith e Stark, 2006). Esse processo de eferocitose ocorre principalmente por macrófagos residentes no fígado, no estroma da medula óssea e na zona marginal do baço (Gordy *et al.*, 2011). Ele é essencial para a manutenção da homeostase dos organismos. Através da apoptose dos neutrófilos e consequente fagocitose dos debris celulares pelos macrófagos, evita-se a liberação de componentes intracelulares tóxicos, que contribui diretamente para a restauração do equilíbrio do indivíduo (McCracken; Allen, 2014).

A apoptose é o processo de morte celular programada onde a célula promove sua autodestruição, através de mecanismos intracelulares como a ativação de enzimas que degradam seu DNA e as proteínas citoplasmáticas (Kumar *et al.*, 2005). As caspases são as enzimas mais importantes nesse processo. Através da ativação das mesmas a célula sofre a condensação da cromatina, a ruptura do núcleo, a contração do citoplasma, como também sofre alterações na simetria sem perda da integridade da membrana plasmática e fragmentação

de célula em corpos menores (corpos apoptóticos). Além disso, acontece a clivagem do material genético e despolarização mitocondrial (Vermes, Haanen e Reutelingsperger, 2000; Kobayashi e Deleo, 2009; Wang, 2014).

Existem dois mecanismos básicos que iniciam a apoptose dos neutrófilos: as vias intrínseca e extrínseca de ativação de apoptose celular. Em ambas há a participação efetiva das caspases, mas o que diferencia uma da outra é que na primeira, a ativação dos mecanismos de apoptose ocorre independente de qualquer interação de receptor-ligante externo na célula. Já a segunda forma é ativada pela ligação de fatores externos como o fator de necrose tumoral (TNF- α), a ligação de Fas ao seu receptor específico e a ligação do indutor de apoptose relacionado a TNF aos receptores de morte presentes na membrana plasmática da célula (Kennedy e Deleo, 2009; Nikolettópoulou *et al.*, 2013).

A apoptose dos neutrófilos pode ser regulada pelo balanço redox da célula. Diversos trabalhos científicos mostram que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) dessas células pode influenciar na sobrevivência das mesmas. Neutrófilos de pacientes com a doença granulomatosa crônica apresentam menores taxas de apoptose do que células de indivíduos capazes de produzir ERO normalmente (Kasahara *et al.*, 1997). Corroborando com esses dados, condições de hipóxia, como no caso das articulações dos pacientes com Artrite Reumatóide, aumentam a sobrevivência de neutrófilos na sinóvia desses pacientes (Cross *et al.*, 2006). Neutrófilos tratados com xantina oxidase, que induz a produção do ânion superóxido, e glicose oxidase que induz a produção de peróxido de hidrogênio, apresentam maior porcentagem de células em apoptose do que células sem os respectivos tratamentos ou quando tratadas com a catalase (Rollet-Labelle *et al.*, 1998). O balanço redox também pode influenciar a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Por sua vez, esse fator de transcrição quando ativado, interfere no balanço de proteínas anti e pró-apoptóticas, favorecendo a integridade da mitocôndria e a sobrevivência dos neutrófilos (Barcellos-De-Souza *et al.*, 2012).

Mais recentemente foi mostrado os possíveis mecanismos pelos quais as ERO poderiam influenciar na apoptose dos neutrófilos. O que contribuiu para isso foi a descrição da morte celular induzida por fagocitose (phagocytosis-induced cell death - PICD, da sigla em inglês). Ela acontece quando os neutrófilos realizam a fagocitose de partículas ou microrganismos, culminando com a produção de ERO e a liberação da protease catépsina presente nos grânulos azurófilos para o citoplasma da célula. Essa enzima inibe proteínas anti-apoptóticas como a Mcl-1, e ativa proteínas pró-apoptóticas como a caspase 8 e a Bid (McCracken; Allen, 2014).

Defeitos nos mecanismos regulatórios da apoptose podem resultar no acúmulo de células indesejáveis para o bom funcionamento do organismo, gerando inúmeras anomalias como neoplasias, doenças neuromusculares e doenças autoimunes (Luan *et al.*, 2015).

1.3. Quimiotaxia

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório. Infecções ou inflamação estéril são caracterizadas por um rápido influxo dessas células para o tecido inflamado (Summers *et al.*, 2010; Headland e Norling, 2015). Elas são guiadas até o foco da inflamação por meio de moléculas de adesão expressas no endotélio dos vasos sanguíneos e também por agentes quimiotáticos. Quando um agente infeccioso, por exemplo, é fagocitado por um leucócito residente no tecido, esse secreta substâncias que aumentam a expressão de moléculas como as P-selectinas e E-selectinas no endotélio, possibilitando a interação dos neutrófilos com o vaso. O neutrófilo interage com essas moléculas por meio de integrinas na membrana celular. Após a interação com os vasos ocorre o processo de rolamento que é mais dependente das moléculas selectinas. Esse processo culmina com a firme adesão dos neutrófilos ao vaso e a transmigração das células através do endotélio (Borregaard, 2010; Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Atualmente existem dois mecanismos descritos para explicar como os neutrófilos realizam a transmigração do endotélio: o paracelular e o transcelular. No primeiro, o neutrófilo atravessa o endotélio por meio das junções entre duas células endoteliais. Já no segundo, a célula do vaso forma uma estrutura chamada de “domo” envolvendo o neutrófilo e permitindo que o mesmo atravesse o vaso sanguíneo em direção ao gradiente quimiotático (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Os neutrófilos detectam os agentes quimiotáticos através dos receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptor - GPCR, da sigla em inglês) em sua membrana plasmática. Existem várias subclasse de proteína G na célula. Um mesmo agente quimiotático é capaz de ativar, concomitantemente, proteínas G diferentes. Se a proteína G_i é ativada, desencadeia-se a formação dos pseudópodes na região frontal da célula. Por sua vez, quando proteínas G_{12} e G_{13} são ativadas, há a ativação da miosina e redução na sensibilidade das demais regiões da célula ao agente quimiotático. Esses sinais divergentes promovem a polarização do neutrófilo e existe uma regulação intrínseca entre eles (Xu, *et al.*, 2003).

Os mais importantes GPCRs expressos em neutrófilos são: receptores para fMLP (FPR1/2/3), receptores para o leucotrieno B_4 (LTB_4 - BLT1/2), receptores para as quimiocinas

CXCL1 e CXCL2 (CXCR1 e CXCR2), receptor para o fator ativador de plaquetas (PAF - PAFR) e receptores para componentes solúveis do sistema complemento C5a e C3a (C5aR) (Randis *et al.*, 2008; Alves-Filho *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2011; Futosi, Fodor e Mocsai, 2013).

A quimiotaxia de neutrófilos é dependente da dinâmica de polimerização do citoesqueleto da célula (Chung, Funamoto e Firtel, 2001; Affolter e Weijer, 2005; Petry, Weitnauer e Gorlach, 2010). Substâncias com atividade “scavenger” interferem na quimiotaxia de neutrófilos por impedir que as ERO atuem na oxidação da fosfatase lipídica (PTEN - Phosphatase and tensin homolog, da sigla em inglês) que está relacionada com o balanço nos níveis de fosfatidilinositol 3-fosfato na célula e esse por sua vez é importante para a ativação de pequenas GTPases da família Rho, como as Rac e Cdc42, que promovem a formação dos polímeros de actina (Ridley, 2001; Tapon and Hall, 1997; Benard *et al.*, 1999; Kuiper, *et al.*, 2011).

1.4. Receptores dependentes de opsonização

1.4.1. Receptores Fcγ

As imunoglobulinas G são os anticorpos mais abundantes em humanos e fazem uma ligação importante entre a imunidade humoral e celular, além de relacionar a imunidade adaptativa com mecanismos da imunidade inata. A porção Fc (fragmento cristalizável) da IgG pode ser reconhecida por receptores Fcγ presentes na membrana de várias células do sistema imunológico, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK) e neutrófilos (Jovanovic *et al.*, 2009). Dependendo da sua forma e estrutura química, esses receptores são classificados em FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) -subdividido em FcγRIIa e FcγRIIb- e FcγRIII (CD16) - subdividido em FcγRIIIa e FcγRIIIb (Bruhns *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011; Futosi, Fodor e Mocsai, 2013).

Os neutrófilos são as únicas células que apresentam de forma constitutiva dois desses receptores envolvidos na sua ativação, FcγRIIa e FcγRIIIb. O FcγRI passa a ser expresso na membrana dos neutrófilos quando estes são ativados por citocinas inflamatórias, como o interferon-γ (Van Der Poel *et al.*, 2011). Este último receptor, o FcγRI, apresenta grande afinidade para moléculas de IgG monoméricas (10^{-9} - 10^{-10} mol/L), enquanto os dois primeiros, FcγRIIa e FcγRIIIb, possuem baixa afinidade para estas moléculas (10^{-7} mol/L), sendo preferencialmente ligados a agregados de IgG (Bournazos *et al.*, 2009; Nuutila, 2010).

O FcγRIIa é um receptor estimulatório que possui em sua região citoplasmática um domínio do tipo imunorreceptor com domínio de ativação baseado em tirosina (ITAM), (Ramsland *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). Ele está relacionado com vias de sinalização intracelulares que medeiam a fagocitose, como a via das proteínas adaptadoras Src. Além disso, este receptor desencadeia as etapas subsequentes que levam à formação do fagolisossoma, com a liberação do conteúdo lisossomal, tanto intra como extracelular. Através desses mecanismos, o FcγRIIa participa da eliminação de patógenos opsonizados por componentes do soro (Clark e Petty, 2010). A isoforma FcγRIIb, por sua vez, é um receptor inibitório que possui em sua região citoplasmática um domínio do tipo imunorreceptor com motivo de inibição baseado em tirosina (ITIM). A ausência desse receptor pode aumentar a gravidade de algumas doenças como a artrite reumatóide (Belostocki *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2010).

O FcγRIIIb não possui uma região terminal citoplasmática e está inserido na membrana por meio de uma âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI). Ele é expresso em neutrófilos, sendo que essa expressão acontece de forma abundante, pois cada célula apresenta entre 100.000 a 200.000 receptores. O FcγRIIIb, quando ativado, promove pouca ou nenhuma ativação de vias de sinalização que induzem fagocitose, contudo esse receptor parece ser importante para a produção de ERO em resposta a imunocomplexos (Radstake *et al.*, 2006). Neutrófilos apoptóticos perdem a expressão desse receptor. Esse fenômeno pode ser utilizado como marcador de células apoptóticas (Moulding, Hart e Edwards, 1999).

1.4.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento

O sistema complemento é composto por mais de 30 componentes, entre proteínas de membrana e solúveis. Ele é um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata, com importante relevância na imunidade adaptativa (Dunkelberger e Song, 2010; Ricklin *et al.*, 2010; Skattum *et al.*, 2011).

As células fagocíticas expressam em suas membranas receptores para componentes solúveis do complemento (CR), que auxiliam no processo de fagocitose, pois tais componentes atuam opsonizando partículas que serão fagocitadas. Esses receptores são: CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18; Mac-1) e CR4 (CD11c/CD18). Os neutrófilos expressam os receptores CR1, CR3 e CR4 (Huang *et al.*, 2011). Os CR3 e CR4 são compostos por duas subunidades, sendo uma delas um dímero comum entre todos os CR (CD18) e a outra uma subunidade variável (CD11) (Dunkelberger e Song, 2010).

Os receptores CR1 induzem fagocitose pela ligação principalmente de C3b e C4b, sendo que C3bi também pode ligar-se ao CR1. Esses componentes são produzidos pela quebra de fatores solúveis em resposta a infecções e a sua ligação ao CR1 ativa vias de transdução de sinais relacionados à ativação de mecanismos microbicidas (Ricklin *et al.*, 2010).

Os receptores CR3 são ativados durante a resposta inicial a infecções preferencialmente pela ligação à C3bi, culminando também na ativação de mecanismos microbicidas como fagocitose e produção de ERO (Huang *et al.*, 2011; O'brien *et al.*, 2012). Quando ele é ativado ocorre um acúmulo dos neutrófilos no sítio inflamatório e a ativação da enzima fosfolipase D, como também e a polimerização do citoesqueleto de actina (Fallman, Andersson e Andersson, 1993; Serrander, Fallman e Stendahl, 1996).

Os CR exercem outras funções, além da promoção da fagocitose. Eles atuam na regulação das cascatas das vias clássica e alternativa do complemento, inibindo essas vias através da interferência na estabilização das convertases. Além disso, os CR participam da eliminação de complexos imunes da circulação, por facilitar a ligação dos mesmos aos eritrócitos (Khera e Das, 2009).

1.5. Fagocitose

A fagocitose é um processo ativo que depende da polimerização do citoesqueleto de actina, onde partículas com tamanho maior que 0,5 μm de diâmetro são endocitadas por diferentes mecanismos (Underhill e Goodridge, 2012). Esse é um mecanismo importante na eliminação de patógenos e células apoptóticas.

No sistema imunológico a fagocitose tem importância tanto para os mecanismos da imunidade inata quanto da adaptativa, pois além de promover a destruição dos patógenos, é através da fagocitose que componentes dos agentes infecciosos são apresentados às células da imunidade adaptativa para a montagem de uma resposta imune efetiva (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Os neutrófilos, juntamente com os macrófagos e células dendríticas, formam um grupo de células denominado de fagócitos profissionais (Soehnlein e Lindbom, 2010). Os neutrófilos preparam-se para realizar a fagocitose, organizando em sua membrana os receptores que possibilitam o reconhecimento dos agentes a serem fagocitados. Os principais receptores são os dependentes de opsoninas, que possibilitarão o reconhecimento das partículas opsonizadas (Borregaard, 2010).

A membrana dos neutrófilos apresenta dois tipos de receptores que se ligam a opsoninas: os receptores para o fragmento cristalizável das imunoglobulinas (FcR) e os receptores para componentes solúveis do sistema complemento (CR) (Cascao, R. *et al.*, 2010). Dependendo de qual receptor está sendo utilizado para a realização da fagocitose ocorre diferenças na internalização do alvo a ser fagocitado. Quando o receptor é o Fc γ , os neutrófilos formam extensões de suas membranas capazes de envolver o patógeno. Esse modelo de fagocitose é denominado de “zíper”. O segundo modelo de internalização ocorre quando são utilizados os CR3 (CD11b/CD18). Nesse caso, não acontece a extensão da membrana celular e o processo é denominado de “gatilho”. Essas duas vias de desencadeamento da fagocitose diferenciam-se por meio da forma como o citoesqueleto de actina da célula é ativado, promovendo a formação da lamelipodia ou conformação ramificada do citoesqueleto, no caso da fagocitose desencadeada via Fc γ R, ou da filopodia ou polimerização por alongamento, no caso da fagocitose via CR3 (Jaffe & Hall, 2005; Freeman & Grinstein, 2014) (ver figura 1.2).

Nos neutrófilos e macrófagos, o fagossoma formado é fundido com vesículas lisossomais, originando o fagolisossoma, onde os agentes infecciosos ou partículas engolfadas são rapidamente destruídos pela ação das enzimas líticas e das ERO (Costa, Germina e Hirsch, 2010; Nunes e Demareux, 2010).

1.6. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

As espécies reativas de oxigênio atuam como umas das ferramentas mais importantes na eliminação dos agentes infecciosos. Elas são capazes de oxidar biomoléculas, causando modificações estruturais nas mesmas, ocasionando perda de função, como também podem atuar no papel de segundo mensageiro durante a sinalização celular (Filippin *et al.*, 2008; Brown e Griendling, 2009). As principais ERO produzidas pelos neutrófilos incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), os radicais hidroxila ($HO^{\cdot}$), e o oxigênio singlete (1O_2) (El-Benna, Dang e Perianin, 2010; Ahmad *et al.*, 2012; Amulic *et al.*, 2012).

As enzimas mais importantes na produção das ERO são o complexo enzimático da NADPH oxidase e a mieloperoxidase (MPO). A primeira é responsável pela produção do ânion superóxido, enquanto a segunda produz, na presença de íons cloro, o cloreto de hidrogênio (Klebanoff *et al.*, 2013; Winterbourn e Kettle, 2013).

1.6.1. NADPH oxidase

As NADPH oxidases são uma família de enzimas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio. Nos mamíferos existem sete distintos membros dessa família: NOX1–NOX5, dual oxidase 1 (DUOX1) e dual oxidase2 (DUOX2) (Cachat *et al.*, 2015). A NOX2 é predominante expressa nos fagócitos profissionais, especialmente nos macrófagos e neutrófilos, mas também nas células dendríticas.

Essa enzima é fundamental na produção das ERO que por sua vez, têm papel especial na eliminação do agente infeccioso. Contudo, a NADPH oxidase atua também no estabelecimento do pH ideal para o funcionamento adequado do fagossoma dos fagócitos profissionais. Pacientes com a doença granulomatosa crônica, que não possuem a NADPH oxidase de forma ativa, exibem o fagossoma dos neutrófilos mais ácidos do que indivíduos saudáveis. Isso compromete o funcionamento das proteases neutras dessas células (Segal, 2005).

O complexo enzimático da NOX2 é formado por subunidades citosólicas e de membrana. Os componentes de membrana gp91^{phox} (phox: fagócito oxidase) e p22^{phox} formam o citocromo b₅₅₈, que fica localizado principalmente junto à membrana dos grânulos específicos (Bylund *et al.*, 2010; Vethanayagam *et al.*, 2011). Os componentes citosólicos são as proteínas p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e Rac2, que se encontram reunidas na forma de um complexo e são recrutadas para a membrana quando as células são estimuladas (Borregaard, 2010; Petry, Weitnauer e Gorch, 2010).

Em resposta à ativação celular os componentes citosólicos são fosforilados e migram para a membrana, formando o complexo ativo capaz de transferir elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, catalisando a reação $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$. O componente gp91^{phox} é o responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o O₂, visto que ele está associado a moléculas de FAD, NADPH e dois grupos hemes. Já o componente p47^{phox} tem sido descrito como o regulador da ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase (El-Benna, Dang e Perianin, 2010; De Oliveira-Junior *et al.*, 2011).

O O₂^{·-}, produzido pela redução do O₂ catalisada pela NADPH oxidase, pode ser convertido, espontaneamente ou por ação enzimática da superóxido dismutase, em H₂O₂. Este, por sua vez, pode reagir com íons metálicos e o próprio O₂^{·-}, produzindo compostos como HO[·], ou servir de substrato para a enzima MPO. Presente nos grânulos azurófilos, essa enzima também desempenha um papel importante na produção de ERO (El-Benna, Dang e Perianin, 2010).

1.6.2. Mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase (MPO) é uma das hemeperoxidases encontrada nos mamíferos, sendo uma das proteínas mais abundantes nos neutrófilos, constituindo cerca de 5% do peso seco total dessas células. A MPO também pode ser encontrada em eosinófilos, denominada peroxidase de eosinófilos, como também em monócitos (Prokopowicz *et al.*, 2012; Odobasic, Kitching e Holdsworth, 2016).

Ela é responsável por converter o H_2O_2 , na presença de íons haleto como Cl^- , Br^- e I^- , em moléculas com forte poder oxidante como ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipoiódoso (HOI), respectivamente. Contudo, a formação preferencial por HOCl , dá-se em virtude da elevada concentração de íons Cl^- nos fluidos biológicos (Van Der Veen, De Winther e Heeringa, 2009).

Na forma nativa, o grupo heme da MPO possui uma molécula de ferro no estado férrico (Fe^{3+}) que reage com o H_2O_2 , formando um primeiro composto intermediário da enzima, denominado de composto I (Fe^{4+}). Por sua vez, este composto reage com Cl^- formando o HOCl e reduzindo a MPO para o estágio nativo (MPO^{3+}), numa reação que envolve a transferência de dois elétrons. Essa etapa é denominada de ciclo da halogenação e é de grande importância para os mecanismos de defesa dos fagócitos, pois seus produtos são potentes agentes microbicidas (Van Der Veen, De Winther e Heeringa, 2009; Metzler *et al.*, 2014).

O composto I também está relacionado com o ciclo peroxidativo, onde reage com outros compostos doadores de elétrons, sendo reduzido ao intermediário II. Esse, por sua vez, é reduzido ao estágio nativo (MPO^{3+}). A MPO no estágio nativo pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$, transformando-se em um composto III. Este composto III pode também ser formado a partir do composto II na presença de excesso de H_2O_2 . Além disso, a MPO também é capaz de produzir outras ERO como os radicais hidroxila e oxigênio singlete (Prokopowicz *et al.*, 2012).

As ERO podem causar dano tecidual e, portanto, o organismo mantém um equilíbrio na sua produção pela presença de enzimas como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, que convertem as ERO em compostos não tóxicos. Além disso, substâncias antioxidantes não-enzimáticas, representadas pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes presentes na alimentação atuam evitando o estresse oxidativo (Filippin *et al.*, 2008).

A MPO está relacionada com o agravamento de muitas patologias, tendo em vista que as ERO que são produzidas por ela não têm especificidade e podem, além de eliminar o patógeno, trazer danos para os tecidos adjacentes. Em doenças como a Artrite Reumatóide, onde há um recrutamento em massa de neutrófilos afim de fagocitar os imunocomplexos depositados na cartilagem, as ERO causam sérios danos (Mayadas, Cullere e Lowell, 2014).

Além da atividade já descrita, tem sido reportado que a MPO pode ter papéis não relacionados com a sua atividade enzimática. Ela pode regular as funções tanto de células do sistema imunológico como células de outros tecidos. Por exemplo, a ligação da MPO nas moléculas CD11b/CD18 em neutrófilos pode induzir a ativação dessas células, levando à produção de ERO e até a desgranulação. Além disso, aumenta a sobrevivência dos neutrófilos, o que contribui para acentuar o processo inflamatório (Lau *et al.*, 2005; El Kebir *et al.*, 2008).

Recentemente, tem sido descrito que a MPO tem participação ativa na formação e liberação das redes extracelulares de DNA, histonas e componentes dos grânulos de neutrófilos (NETs, da sigla em inglês), por facilitar a liberação da elastase dos grânulos azurófilos e a dinâmica do citoesqueleto de actina (Metzler *et al.*, 2014).

Figura 1.1: Esquema simplificado da ativação dos neutrófilos e produção das espécies reativas de oxigênio. Ao reconhecer agentes infecciosos, opsonizados por imunoglobulinas e componentes do complemento, via receptores Fc e CR3, os neutrófilos ativados produzem o ânion superóxido através da montagem do complexo enzimático da NADPH oxidase na membrana do fagossoma. O ânion superóxido sofre dismutação pela superóxido dismutase formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por sua vez, o H_2O_2 , pela ação da mieloperoxidase (MPO) será convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies halogenadas. Fonte: Quinn, et. al., 2006.

1.7. Grânulos: produção e liberação

A Granulopoiese é o processo de diferenciação dos leucócitos da linhagem mielóide na medula óssea onde os granulócitos, grupo de células hematopoiéticas no qual os neutrófilos estão inseridos, desenvolvem grânulos citoplasmáticos (Borregaard, 2010). Nessas células, a nomeação dos grânulos dá-se em primários ou azurófilos, secundários ou específicos, terciários ou ricos em gelatinase, além das vesículas secretórias (Soehnlein e Lindbom, 2010).

Os constituintes das vesículas secretórias são basicamente receptores de membrana, o que possibilita a célula reconhecer os patógenos e favorecer a interação do neutrófilo com o endotélio (Cascao, Rosario e Fonseca, 2009). Quando fusionadas com a membrana da célula, essas vesículas aumentam significativamente a expressão, na superfície celular, de CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18), que são receptores para componentes solúveis do sistema complemento, além de receptores para formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Além disso, essas vesículas possuem o citocromo b_{558} , que faz parte do complexo enzimático da

NADPH oxidase, responsável pelo início da produção de ERO (Paulsson, Jacobson e Lundahl, 2010).

Os grânulos terciários são formados basicamente de metaloproteínases, como as gelatinases, enzimas capazes de degradar componentes da matriz extracelular, o que facilita o processo de diapedese e migração dos neutrófilos. Os grânulos secundários são caracterizados por apresentar em sua constituição proteases e substâncias com atividade microbicida, tais como, a lisozima e a lactoferrina, que são recrutadas para o fagossoma ou meio extracelular. Já os grânulos primários são ricos em hidrolases lisossomais, defensinas, catepsina G, elastase e a mieloperoxidase (MPO), importantes para o processo de destruição dos patógenos fagocitados (Van Der Veen, De Winther e Heeringa, 2009; Bardoel *et al.*, 2014).

Quando os neutrófilos são primados ou ativados inicia-se a mobilização dos grânulos e vesículas de forma sequencial, sendo as vesículas secretórias as primeiras a serem mobilizadas, seguidas pelos grânulos terciários, secundários e primários.

1.7.1. Desgranulação da enzima elastase

A elastase faz parte de um grupo de enzimas denominado de serino-proteases de neutrófilos. Ela é considerada uma das enzimas mais importantes da imunidade inata, tendo em vista que é efetiva contra fungos e bactérias (Pham, 2006; Stapels, Geisbrecht e Rooijackers, 2015). Seu local de estoque são os grânulos azurófilos, onde estão associadas as proteoglicanas numa conformação inativa. À medida que o consumo de prótons pela produção das ERO eleva o pH do fagossoma esse passa a ter as condições ideais para que a elastase, uma protease que atua em pH neutro, possa agir com mais facilidade (Reeves *et al.*, 2002) (ver figura 1.2).

A elastase é essencial para a eliminação de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* (Belaouaj *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 2011). Por sua vez, ratos deficientes em elastase não conseguem eliminar bactérias gram negativas (Belaouaj *et al.*, 1998). Além disso, ela é responsável pela degradação das proteínas da matriz extracelular, promovendo o remodelamento do tecido danificado e facilitando a migração dos neutrófilos em direção ao foco inflamatório (Heinz *et al.*, 2012).

Recentemente, tem sido observado que a elastase é importante para a formação e a liberação das NETs. Ela é recrutada para o núcleo da célula e atua na degradação das histonas, o que facilita a liberação e descondensação do material genético do núcleo, promovendo a formação das redes extracelulares de DNA associado à histonas e proteínas granulares (Papayannopoulos *et al.*, 2010; Metzler *et al.*, 2014).

Apesar de todos os benefícios da elastase, e dos mecanismos que controlam a sua liberação e ativação dos grânulos primários, ela está relacionada com a patologia de algumas doenças como as doenças pulmonares e a Artrite reumatóide, tendo em vista que o acentuado recrutamento de neutrófilos para os tecidos inflamados, e a ativação inapropriada dos mesmos, possibilita a liberação desordenada dessa enzima (Adkison *et al.*, 2002; Hu e Pham, 2005).

Figura 1.2: Representação esquemática dos fatores envolvidos na compensação de carga através da membrana fagossomal e a liberação da enzima elastase dos grânulos. A geração de ânion superóxido pela NADPH oxidase na membrana fagolisossomal, gera um influxo de íons H^+ dos grânulos primários dos neutrófilos, o que reduz o pH desse compartimento e possibilita a liberação da enzima elastase da matriz de proteoglicana. Para compensar o aumento de pH no vacúolo, ocorre o influxo de íons K^+ e H^+ do citoplasma da célula afim de otimizar as condições de pH para que a enzima elastase funcione adequadamente. Fonte: Reeves, et. al., 2002.

1.8. NETs: formação e liberação

Em 2004, pesquisadores verificaram pela primeira vez, que neutrófilos humanos eram capazes de liberar uma estrutura formada de DNA associado à histonas e à moléculas protéicas dos grânulos citoplasmáticos, como a elastase, a mieloperoxidase e a catepsina G. Essas estruturas foram denominadas de NETs, da sigla em inglês para “Neutrophil Extracellular Traps”. Elas podem ser formadas também em outras células do sistema imune como por exemplo nos eosinófilos, nos macrófagos e nos mastócitos (Brinkmann *et al.*, 2004).

As NETs são liberadas quando os neutrófilos são ativados por diversos estímulos. Estes incluem, quimiocinas como a IL-8; citocinas, como o TNF- α ; componentes derivados de agentes infecciosos, como o LPS e o fMLP; bactérias, como o *Staphylococcus aureus*; fungos como, a *Candida glabrata*; protozoários, como o *Toxoplasma gondii*; fatores orgânicos, como os imunocomplexos e o fator ativador de plaquetas (PAF); e agentes farmacológicos, como o PMA (Zawrotniak e Rapala-Kozik, 2013; Pruchniak, Kotula e Manda-Handzlik, 2015; Stoiber *et al.*, 2015). A formação das NETs pelos neutrófilos está relacionada com o tamanho do patógeno, sendo que quanto maior o agente infeccioso mais dificuldade o neutrófilo tem para fagocitá-lo e mais NETs serão liberadas como um mecanismo para destruí-lo (Branzk *et al.*, 2014).

A elastase atua nesse processo facilitando a degradação de histonas ligadas ao material genético, o que possibilita a liberação do DNA e a descondensação do mesmo. Por sua vez, a enzima mieloperoxidase é importante para que a elastase seja liberada dos grânulos azurófilos e migrem até o núcleo da célula afim de exercer o seu papel na liberação das NETs (Papayannopoulos *et al.*, 2010).

As ERO são fundamentais para a formação e liberação das NETs, observado em experimentos onde se utilizou PMA (Fuchs *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2010; Nishinaka *et al.*, 2011; Keshari *et al.*, 2013). Além disso, pacientes com a doença granulomatosa crônica, onde os neutrófilos desses indivíduos não produzem ERO, são incapazes de formar e liberar as NETs (Bianchi *et al.*, 2010). Isso também foi reforçado quando foram empregadas substâncias antioxidantes, que atuam como “scavenger” de ERO ou interferem no funcionamento da NADPH oxidase e da mieloperoxidase (Kirchner *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Vorobjeva e Pinegin, 2016).

Dentre outros efeitos benéficos, é sabido que as NETs tem papel de impedir a disseminação de agentes infecciosos através da corrente sanguínea (Fuchs, Brill e Wagner, 2012) e limitar a inflamação (Schauer *et al.*, 2014). Contudo elas reforçam a patologia de inúmeras doenças, como é o caso das doenças autoimunes, onde aumentam a possibilidade de surgimento de novos autoantígenos, dentre outros eventos, acentuando e tornando crônico o processo inflamatório (Sangaletti *et al.*, 2012; Khandpur *et al.*, 2013).

1.9. Mobilização e influxo de cálcio em Neutrófilos

O cálcio (Ca^{2+}) é essencial para a função dos fagócitos. Ele atua como um segundo mensageiro controlando várias funções nessas células, como a adesão ao endotélio, a

quimiotaxia, a fagocitose, a produção das ERO, a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, dentre outros processos (Nunes e Demaurex, 2010).

O aumento de Ca^{2+} no citoplasma da célula dá-se por dois mecanismos: a liberação dos íons cálcio dos estoques intracelulares, também chamado de mobilização de Ca^{2+} , e a abertura dos canais de Ca^{2+} na membrana da célula, um processo chamado de influxo de cálcio. Essas duas vias são inter-conectadas (Parekh e Putney, 2005).

Nos neutrófilos, a entrada de cálcio na célula dá-se por meio dos canais de cálcio operados pelo estoque (SOCE, da sigla em inglês) ou de maneira independente (não-SOCE). Quando a célula é estimulada via os receptores $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ e $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$, ocorre a ativação das vias de sinalização celular dependente de quinases, promovendo a ativação das isoformas da enzima fosfolipase C (PLC) que aumentam a produção de fosfatidilinositol 3-fosfato (IP_3). Por sua vez, esse composto liga-se nos seus receptores na membrana do retículo endoplasmático (RE) e promove a liberação do cálcio desse estoque para o citosol da célula. A mobilização do cálcio do RE promove então a ativação dos canais de cálcio da membrana da célula (Zhang *et al.*, 2014).

O cálcio é essencial para que os neutrófilos possam migrar até o local da inflamação ou infecção. Essa molécula está envolvida diretamente em todos os estágios do ciclo de migração dessas células (Ridley *et al.*, 2003). O influxo de íons Ca^{2+} em neutrófilos é sincronizado com a adesão dessas células ao endotélio por meio das integrinas, culminando com a ativação do citoesqueleto e polarização das células em direção ao foco inflamatório. Se os canais de cálcio são bloqueados, interrompe-se esse processo, comprometendo a quimiotaxia dos neutrófilos (Schaff *et al.*, 2008).

A produção extracelular de ERO por neutrófilos humanos estimulados com fMLP e PMA é comprometida quando as células são tratadas com o 3,5-bis trifluorometil pirazol (BTP), um inibidor de canais de Ca^{2+} (Steinckwich *et al.*, 2007). O cálcio é essencial para a ativação da enzima NADPH oxidase (Brechard e Tschirhart, 2008). Pesquisas mostram que o canal de Ca^{2+} denominado STIM1 (Stromal interaction molecule 1), presente no retículo endoplasmático dos neutrófilos, é essencial para que ocorra o influxo de cálcio na célula e ela possa realizar a fagocitose (Nunes *et al.*, 2012). Esse mesmo canal é indispensável para que ocorra a ativação da enzima NADPH oxidase (Zhang *et al.*, 2014).

A desgranulação de neutrófilos também depende da oscilação de íons de cálcio em seu citosol (Richter *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2014). A ausência dos íons Ca^{2+} não impede que neutrófilos fagocitem partículas de fungos opsonizados com proteínas do sistema

complemento, mas comprometem a maturação do fagolisossoma (Jaconi *et al.*, 1990). Da mesma forma, neutrófilos na ausência total de Ca^{2+} foram capazes de fagocitar a bactéria *Staphylococcus aureus*, mas não conseguiram eliminar a bactéria (Wilsson *et al.*, 1996).

1.10. Polimerização do Citoesqueleto de Actina de Neutrófilos

Desde o momento que os neutrófilos são ativados por mediadores quimiotáticos, faz-se necessário que a maquinaria do citoesqueleto esteja ativa a fim de promover os eventos de adesão ao endotélio, rolamento, e diapedese da célula até o foco inflamatório. Diversos estímulos que se ligam a receptores associados à proteína G (GPCRs), são capazes de organizar o citoesqueleto de actina dos neutrófilos (Pollard e Borisy, 2003; Dixit *et al.*, 2011; Futosi, Fodor e Mocsai, 2013).

Após migrar para o foco inflamatório, os neutrófilos precisam reconhecer o patógeno, fagocitá-lo, produzir as espécies reativas de oxigênio e liberar o conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos no fagolisossoma em formação. Como visto anteriormente, todos esses eventos são dependentes da mobilidade do citoesqueleto da célula, mostrando o quanto essas células precisam da polimerização do citoesqueleto de actina para executar as funções relacionadas com a morte e a eliminação dos patógenos (Nunes e Demarex, 2010; Sakai *et al.*, 2012).

A polimerização do citoesqueleto de actina da célula é realizada de duas maneiras distintas: a polimerização por alongamento ou Filopoidia, onde monômeros de actina são adicionados de forma linear à rede de actina formada. Nesse primeiro modo de ativação do citoesqueleto ocorre a participação das GTPases Rho e da proteína formina, que possibilitam acontecer o alongamento do citoesqueleto. Além disso, essa é a via responsável pelo desencadeamento da fagocitose, quando receptores CR3 estão envolvidos. A segunda forma de polimerização do citoesqueleto de actina é denominada de ramificada ou Lamelipoidia, na qual acontece a bifurcação do citoesqueleto. GTPases do tipo Rac e Cdc42, juntamente com a proteína Arp2/3 promovem a ramificação do citoesqueleto (Jaffe & Hall, 2005). Quando a célula é estimulada via FcγR predomina a polimerização ramificada do citoesqueleto (Freeman & Grinstein, 2014) (ver figura 1.3).

A dinâmica do citoesqueleto das células sofre influência direta do balanço redox que as mesmas estão submetidas, seja pela produção de espécies reativas de oxigênio provenientes do metabolismo mitocondrial ou dos complexos enzimáticos da NAPH oxidase, maior fonte de ERO nas células. O Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) produz profundas modificações em

monômeros e filamentos de actina em células submetidas ao tratamento com esse composto. Eles são responsáveis por modificar grupos tiol em resíduos de cisteína, oxidando esses resíduos e causando modificações na estrutura da actina (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Recentemente, pesquisas mostraram que a oxidação de grupos tiol em resíduos de cisteína do citoesqueleto de actina, pode controlar a dinâmica da polimerização da actina nos neutrófilos. Animais modificados geneticamente, no intuito de não expressarem a proteína glutaredoxina 1, enzima responsável pela redução dos resíduos tiol da actina, apresentaram neutrófilos com dificuldades de migrar para o foco inflamatório, como também de eliminar o patógeno. Além disso, células de indivíduos com a doença granulomatosa crônica e neutrófilos de indivíduos saudáveis tratadas com DPI, apresentaram um acentuado aumento na polarização do citoesqueleto de actina (Sakai *et al.*, 2012).

Figura 1.3: Sinergismo de receptores durante o processo de fagocitose e as diferentes formas de polimerização do citoesqueleto de actina. Os receptores Fcγ e CR3 cooperam na ativação da célula para a realização do processo de fagocitose de partículas ou agentes infecciosos opsonizados. No entanto, existem diferenças nas vias de sinalização que ambos ativam: os FcγR recrutam GTPases Rac que promovem a polimerização do citoesqueleto de forma ramificada, favorecendo a formação da lamelipódia. Já os CR3 atuam por meio da ativação de GTPases tipo RhoA que culminam com a polimerização do citoesqueleto de forma linear, formando a lamelipódia. Fonte: Freeman S. A & Grinstein S. 2014.

1.11. Participação dos neutrófilos em doenças mediadas pela deposição de imunocomplexos

Os neutrófilos são essenciais no combate aos agentes infecciosos. Com suas funções efetoras de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e desgranulação essas células apresentam ótima atividade microbicida contra bactérias e fungos. No entanto, por possuir mecanismos que não são capazes de distinguir entre as estruturas dos agentes infecciosos e as do hospedeiro, os neutrófilos podem contribuir para a patologia de inúmeras doenças, sobretudo aquelas que têm deposição de imunocomplexos (Mantovani *et al.*, 2011; Mayadas, Cullere e Lowell, 2014).

Um bom exemplo de doença com deposição de imunocomplexos e participação ativa dos neutrófilos é a Artrite Reumatoide (AR). A AR é uma doença inflamatória crônica e sistêmica, de etiologia desconhecida, que pode dificultar ou impossibilitar as funções habituais das articulações devido à destruição da cartilagem, edema e dor (Edwards e Hallett, 1997). Ela é uma doença sistêmica que atinge entre 0,5-1,0% da população mundial levando a hospitalização de 250 mil indivíduos ao ano (Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

A patogênese da Artrite Reumatóide envolve uma complexa interrelação de fatores imunológicos, ambientais e genéticos (Smolen & Steiner, 2003). Dentre os fatores imunológicos, os anticorpos são os mais importantes agentes da etiologia da AR. Nos pacientes com AR são encontrados vários tipos de autoanticorpos. O Fator reumatóide é um desses anticorpos com participação efetiva no prognóstico da doença. Além dele, é possível encontrar autoanticorpos contra proteínas citrulinadas, sendo que esses são detectados na fase pré-clínica da doença e aumentam de acordo com o avanço da mesma. Anticorpos contra o colágeno tipo II também são característicos de pacientes com AR (Majka *et al.*, 2008; Wright, Moots e Edwards, 2014).

Cerca de 90% dos leucócitos presentes na sinóvia inflamada são neutrófilos e esta ativação pode estar associada com a presença de IC de IgG, preferencialmente, no fluido sinovial (Robinson *et al.*, 1992) Krumbhloz *et al.*, 2005). Esses IC ativam os neutrófilos, mas essas células não conseguem finalizar o processo de fagocitose dos mesmos, tendo em vista que eles estão associados à articulação. Dessa forma, os neutrófilos realizam um processo denominado de “fagocitose frustrada” que culmina com a liberação do conteúdo dos grânulos e das ERO na cartilagem, favorecendo a sua destruição (Edwards e Hallett, 1997) (Mayadas, Cullere e Lowell, 2014). Além disso, estímulos inflamatórios presentes na sinóvia inflamada podem favorecer um aumento da permanência dessas células no foco inflamatório (Raza *et*

al., 2006; Cascao, Rita *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Wright, Moots e Edwards, 2014; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

Recentemente, foi verificado que os neutrófilos podem contribuir para a patologia da AR por meio da liberação das NETs. Essas células, em resposta à estímulos encontrados na sinóvia de pacientes com AR, como imunocomplexos, são capazes de mobilizar o material genético do núcleo, associando-o com proteínas dos grânulos citoplasmáticos como, a elastase e a mieloperoxidase. A formação das NETs contribui para a surgimento de novos autoantígenos através da citrulinização de proteínas (Khandpur *et al.*, 2013).

O tratamento da Artrite Reumatóide é baseado no uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs, da sigla em inglês), corticosteróides, drogas anti-reumáticas capazes de modificar a doença (DMARDs, da sigla em inglês) e agentes biológicos como, anti-TNF e anti-IL6 (O'shea, Laurence e Mcinnes, 2013). Os medicamentos convencionais são eficientes. No entanto, eles promovem vários efeitos adversos aos pacientes, levando a não aderência e descontinuidade do tratamento. Considerando este aspecto, novas terapias para AR têm sido buscadas, havendo um grande interesse farmacêutico em princípios ativos de origem vegetal como terapia complementar ou adjuvante ao tratamento convencional, a fim de reduzir as dosagens utilizadas por esses medicamentos (Phillips *et al.*, 2010; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

1.12. Derivados 3-fenilcumarínicos

Os derivados 3-fenilcumarínicos são um grupo de metabólitos secundários, encontrados em plantas e alguns microorganismos, produzidos pela mesma via biossintética dos flavonóides. Eles são também conhecidos como 3-arilcumarinas ou aril-3-cumarinas, possuindo o núcleo básico das cumarinas, porém, sendo classificados como uma subclasse de isoflavonóides (Zuanazzi; Montanha, 2004) (Figura 1.4).

Figura 1.4. Núcleo fundamental dos derivados 3-fenilcumarínicos (Zuanazzi; Montanha, 2004).

Os derivados 3-fenilcumarínicos possuem ampla atividade biológica, como antidepressivo (Sashidhara *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2013; Sashidhara *et al.*, 2014), anticoagulante (Tunali *et al.*, 2004), antioxidante (Roussaki *et al.*, 2010), inibidora da enzima lipoxigenase (Roussaki *et al.*, 2010), inibidora da enzima monoamina oxidase B (Matos *et al.*, 2011; Ferino *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2013), inibidora de esteróide-sulfatases (Demkowicz *et al.*, 2016), inibidora da agregação plaquetária (Tawata *et al.*, 1990), antibacteriana (Nkengfack *et al.*, 2000), inibidora da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (De Marchi *et al.*, 2004), inibidora da replicação viral (Olmedo *et al.*, 2012); inibidora da fosforilação da enzima PKC (Drabikova *et al.*, 2013) inibidora da desgranulação de mastócitos (Santos *et al.*, 2013) e forte atividade “scavenger” de radicais de oxigênio (Roussaki *et al.*, 2010; Svinyarov e Bogdanov, 2014).

Estudos do nosso grupo de pesquisa avaliaram o efeito antioxidante de uma série de derivados 3-fenilcumarínicos frente à enzima *horseadish* peroxidase (HRP) (Kabeya, De Marchi, Kanashiro, Lopes, Da Silva, Pupo e Lucisano-Valim, 2007). Derivados com grupos catecólicos na estrutura tiveram destaque na inibição enzimática. Em outro trabalho, derivados 3-fenilcumarínicos apresentaram atividade inibitória do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados por imunocomplexos, sendo os grupos substituintes hidroxí e acetoxi importantes para a atividade antioxidante. A partir dos resultados obtidos, foram realizadas análises de relação quantitativa estrutura-atividade bidimensional e tridimensional (QSAR-2D e QSAR-3D, respectivamente), que direcionaram a seleção de algumas substâncias, consideradas promissoras como moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos, estimulado via receptores Fcγ (Kabeya *et al.*, 2008b). Mais recentemente, as substâncias

selecionadas foram analisadas quanto ao seu efeito inibitório da enzima mieloperoxidase (MPO) humana isolada. Duas dessas substâncias foram mais eficientes em inibir a MPO, (Andrade *et al.*, 2013). Dessas duas substâncias estudadas, a 6,7-diidroxi-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) possui duas características interessantes na sua estrutura molecular: a presença dos grupo substituinte orto-diidroxi nas posições 6 e 7 do esqueleto cumarínico e uma metilenodioxila ligada ao anel fenílico. A primeira característica estrutural está relacionada com a atividade “scavenger” de ERO que essa substância possui. Já a segunda estrutura aumenta a capacidade dessa substância de interagir com membranas biológicas, servindo como um carreador da mesma para o espaço intracelular, sugerindo que a C13 possua alvos intracelulares de atuação (Van Acker, *et. al.*, 1998; Vuotto, *et. al.*, 2003).

1.13. Incorporação de compostos fenólicos em lipossomas

Os compostos fenólicos têm apresentado várias atividades interessantes para serem aplicados no tratamento de doenças, onde há a participação efetiva dos neutrófilos (Pietta, *et. al.*, 2000). No entanto, esses compostos apresentam baixa solubilidade em água, como também podem sofrer metabolização e, portanto podem não promover seu efeito quando utilizados *in vivo*.

A fim de evitar os problemas de solubilização e metabolização, os compostos fenólicos podem ser incorporados em vesículas carreadoras capazes de entregar mais facilmente a substância no alvo de interesse. Existem diversas estruturas, de forma e composição diferentes que promovem tais benefícios e que têm sido utilizadas na incorporação de fármacos convencionais para o tratamento de várias doenças, especialmente o câncer (Allen e Cullis, 2013). Os lipossomas formam um grupo desses carreadores, pois são construídos com base em produtos biocompatíveis, que não apresentam toxicidade para as células (Gharib *et al.*, 2015). Existem diversos tipos de lipossomas que podem variar de acordo com o tamanho e o número de camadas de membrana lipídicas (Akbarzadeh *et al.* 2013; Pattni *et al.* 2015). Eles evoluíram ao longo dos anos a fim de evitar a sua eliminação pelo sistema retículo-endotelial. Dessa forma, são preparados lipossomas com anticorpos inseridos em sua membrana, no intuito de direcioná-los para o seu alvo específico, como também são formulados lipossomas com polímeros que os impedem de sofrerem opsonização por componentes do sistema complemento e serem eliminados (Torchilin, 2005; Allen e Cullis, 2013; Eloy *et al.*, 2014; Kundu *et al.*, 2014). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa investigaram a desestabilização de lipossomas (LUV - large unilamellar vesicles, da sigla em inglês) vazios

ou contendo flavonóides, pelo sistema complemento e os resultados revelaram que LUV formados de fosfatidilcolina e colesterol, na proporção 5:1, foram os mais adequados para amenizar a ativação do sistema complemento (Landi-Librandi *et al.*, 2011).

1.14. Modelo animal de artrite e tratamento com produtos naturais

Na literatura científica existem diversos modelos animais de artrite e muitos se assemelham às condições da Artrite Reumatóide em seres humanos (Asquith *et al.*, 2009; Mcnamee, Williams e Seed, 2015) e diversos estudos têm avaliado o efeito de compostos fenólicos, como flavonóides e substâncias semelhantes, nesses diferentes modelos (Khanna *et al.*, 2007; Nanjundaiah, Astry e Moudgil, 2013; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015).

Ratos Lewis com artrite induzida por adjuvante (AIA) e tratados com quercetina, apresentaram uma redução nos sinais clínicos da doença. Essa melhora foi correlacionada com uma redução na produção de mediadores inflamatórios e óxido nítrico por macrófagos (Mamani-Matsuda *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que injeção intra-articular de um conjunto de polifenóis em modelo animal de Artrite induzida por colágeno, reduziu a destruição da cartilagem desses animais (Natarajan, Madhan e Tikku, 2015). Animais com AIA, tratados com quercetina (150 mg/kg), reduziram vários parâmetros inflamatórios, correlacionando com um aumento de suas defesas antioxidantes (Gardi *et al.*, 2015). A flavonona hesperidina também foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios nesse mesmo modelo animal (Umar *et al.*, 2013).

Dentre os modelos animais de artrite, o modelo de indução de inflamação articular induzida por zimosan tem sido também utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório de produtos naturais (Penido *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2013). Também nesses estudos, as substâncias naturais foram utilizadas de forma livre e com altas dosagens (Nonose *et al.*, 2014; Bezerra De Oliveira *et al.*, 2015). No entanto, o uso de lipossomas em investigações desta natureza, tem sido empregados, sendo na grande maioria incorporando enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (Van Den Hoven *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2014). Estudos utilizando a incorporação de substâncias naturais e o tratamento de modelos animais de artrite ainda são escassos (Munin, A & Edwards-Lévy, F., 2011, Pascollato, *et al.*, 2015).

Considerando os efeitos biológicos que o derivado 3-fenilcumarínico (C13) possui em relação à modulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via Fcγ e que essas células estão envolvidas na patologia de doenças autoimunes que envolvem a deposição de

imunocomplexos, pesquisas utilizando essa substância são interessantes e necessárias. Nesse sentido, estudos *in vitro*, a fim de verificar os efeitos da C13 nas demais funções efectoras dos neutrófilos, auxiliarão no entendimento dos mecanismos de ação dessa substância, permitindo que a mesma possa servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação terapêutica nessas doenças. No entanto, substâncias antioxidantes são de fácil degradação e metabolização quando administradas *in vivo*. Dessa forma, a incorporação da C13 em lipossomas e o tratamento de animais submetidos à inflamação articular, permitirá analisar se a mesma manterá sua atividade biológica, observada *in vitro*, avançando nas etapas necessárias para que a mesma possa vir a ser utilizada no desenvolvimento de novos fármacos.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos antioxidante e anti-inflamatório do derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidrox-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) em neutrófilos humanos, como também avaliar a aplicação terapêutica dessa substância, encapsulada em lipossomas, em modelo animal de inflamação articular induzida por zimosan.

Para atingir este objetivo, foi desenvolvida a seguinte abordagem experimental:

- Avaliação do efeito inibitório do derivado 3-fenilcumarínico no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fcγ e/ou CR, utilizando IC precipitados formados de OVA e IgG ou F(ab')₂ anti-OVA opsonizados ou não com soro humano normal, como também através do estímulo solúvel PMA. A produção total de ERO e a produção de O₂•⁻ serão realizadas, respectivamente, através dos ensaios de quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina;
- Avaliação da interação do derivado 3-fenilcumarínico com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase humana, através de *docking*;
- Estudo do efeito do derivado 3-fenilcumarínico nos seguintes processos da célula: na capacidade fagocítica de IC, por método de citometria de fluxo; na desgranulação, utilizando elastase como marcador; na atividade microbicida sobre *Candida albicans*; no influxo e mobilização de cálcio, por meio de fluorescência; na polimerização do citoesqueleto de actina, por meio de microscopia confocal; na formação e liberação de NETs, por meio de microscopia confocal e kit comercial;
- Investigação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico na viabilidade celular de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular, através da análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina-V e iodeto de propídio em citometria de fluxo e por meio da liberação da enzima lactato desidrogenase utilizando kit comercial;
- Compreensão do efeito da C13 na quimiotaxia de neutrófilos, *in vitro*, frente aos agentes quimiotáticos fMLP, IL-8 e LTB₄, por meio de câmara de Boyden;
- Verificação do efeito terapêutico da preparação lipossomal com o derivado 3-fenilcumarínico em modelo de artrite em ratos, avaliando-se os seguintes parâmetros: regressão do edema da articulação, por meio de medidas do diâmetro da articulação; avaliação do número de leucócitos totais e neutrófilos no líquido sinovial, por meio de câmara de Neubauer, e quantificação das citocinas inflamatórias TNF-α, IL-1β, IL-6 no líquido sinovial, por meio de ELISA.

III. CASUÍSTICA 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 em um sistema Mili-Q (Merk-Millipore, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha), e esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm ou autoclavagem à 120 °C por 15 minutos.

3.2. Síntese do derivado 3-fenilcumarínico utilizado no estudo

O derivado 3-fenilcumarínico 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) (Figura 1.1) foi sintetizado com a colaboração dos grupos de pesquisa da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo e do Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

A substância foi sintetizada através da reação de Perkin-Oglialoro, onde derivados do ácido fenilacético (Aldrich) reagem com derivados do salicilaldeído (Aldrich), ambos apropriadamente substituídos, em meio contendo anidrido acético e acetato de potássio (De Marchi *et al.*, 2004; Kabeya, De Marchi, Kanashiro, Lopes, Da Silva, Pupo e Lucisano-Valima, 2007; Matos *et al.*, 2011). O derivado 3-fenilcumarínico foi purificado por recristalização, avaliado quanto à pureza por cromatografia em camada delgada e caracterizado pela determinação do ponto de fusão. A amostra apresentou um grau de pureza adequado (99%) para ser utilizada nos ensaios subsequentes. A estrutura química foi elucidada por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, bem como por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*.

Figura 3.1. Estrutura química do derivado 3-fenilcumarínico (C13).

3.3. Preparação dos estímulos

Os anticorpos IgG anti-OVA foram obtidos por meio da imunização de coelhas da espécie Nova Zelândia, fêmeas, jovens e 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 nº 05.1.1050.53.9, anexo A). As etapas de obtenção e a caracterização dos anticorpos estão descritas na Dissertação de Mestrado (Andrade MF. 2012).

3.3.1. Preparação do fragmento F(ab')₂ a partir da molécula de IgG

A preparação do fragmento F(ab')₂ foi obtida pela digestão parcial da porção Fc das moléculas de IgG com solução de pepsina 1 mg/mL em tampão glicina (0,2 mol/L; pH 3,2) conforme descrito por Weir, 1986. O pH da solução contendo IgG foi ajustado para pH 3,2 com HCl e em seguida foi adicionado o tampão glicina. Para cada 100 mg de IgG adicionou-se 2 mg de pepsina e a mistura foi incubada (37 °C, 2h) com agitação ocasional e verificação do pH. Após incubação, o pH foi neutralizado (7-8) com NaOH 1 mol/L, e a fração F(ab')₂ foram precipitados com sulfato de amônio a 50%. O precipitado foi dissolvido em uma pequena quantidade de água e dialisado contra PBS (pH 7,4) no período de 24h.

3.3.2. Preparação dos Imunocomplexos precipitados (IC)

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

Uma alíquota de 50 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 absorbância em 280nm.

3.3.3. Opsonização dos Imunocomplexos precipitados (IC)

Os imunocomplexos foram centrifugados (12000g, 15min, 4 °C). Em cada sedimento de IC formado foi adicionado soro humano normal (SHN) diluído 1:2 em tampão para fixação de

complemento (Weir, 1986) suplementado com 0,1% de gelatina, na proporção de 1 µl e soro para cada 1 µg de IC. Após incubação (30min, 37 °C), as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições e suspensas em PBS na concentração de 1µg/ml. O soro humano normal foi obtido de indivíduos saudáveis. Todos os procedimentos éticos para a obtenção do soro foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa com humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP - FCFRP-USP (CEP/FCFRP-USP, nº 293, anexo 1).

3.3.4. Preparo dos estímulos fMLP, PMA, IL-8 e LTB₄

Esses estímulos foram diluídos e alíquotas armazenadas a -70 C (fMLP, PMA, IL-8) ou a -20 C (LTB₄). No momento do uso foram preparados em solução salina balanceada de Hank's (HBSS).

3.4. Sujeitos da pesquisa

3.4.1. Aspectos éticos

Foram recrutados 30 (trinta) voluntários para a pesquisa nas dependências da FCFRP-USP pelos pesquisadores responsáveis. Eles eram saudáveis, 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 196/96 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-USP, nº 293, anexo B). 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.

3.4.2. Obtenção do material biológico

O sangue colhido de voluntários saudáveis foi utilizado para obtenção dos neutrófilos, conforme descrito a seguir.

3.4.2.1. Obtenção dos neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir de sangue de indivíduos saudáveis, colhido através de punção venosa com sistema a vácuo. A obtenção dos neutrófilos se deu por três diferentes maneiras:

3.4.2.1.1. Obtenção dos neutrófilos através do Método da Gelatina:

O sangue periférico, colhido a partir de sistema a vácuo, foi misturado com volume igual de anticoagulante (Alséver pH 6,1). A técnica utilizada foi a de Henson, 1971, modificada por Lucisano e Mantovani, 1984. O sangue contido no tubo com anticoagulante foi centrifugado (750g, 10 minutos, 25 °C) e o plasma removido. O sedimento foi suspenso em uma solução de gelatina a 2,5% em NaCl 0,15 mol/L, e deixado em repouso por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante contendo neutrófilos foi diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (270g, 10 minutos, 25 °C). As hemácias remanescentes foram lisadas com NH₄Cl 0,83% (pH 7,2) por 5 minutos. As células foram centrifugadas (130g, 10 minutos, 25 °C), lavadas com NaCl 0,15 mol/L, e em seguida suspensas em Solução Salina Balanceada de Hank's (HBSS, da sigla em inglês) (pH 7,2). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão com o corante azul de Tripan.

3.4.2.1.2. Obtenção dos neutrófilos através do Método Ficol-Histopaque: Os neutrófilos foram colhidos através de punção venosa com sistema a vácuo em tubo com heparina como anticoagulante. O sangue colhido foi adicionado a tubos falcon de 15 mL contendo reagente Histopaque®-1119 e Histopaque®-1077 e centrifugado (700g, 30 minutos, 25 °C). As camadas contendo o plasma e as células mononucleares foram descartadas e a parte contendo os granulócitos foi transferida para tubos de fundo redondo, diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (270g, 10 minutos, 25 °C). As hemácias remanescentes foram lisadas com NH₄Cl 0,83% (pH 7,2) por 5 minutos. As células foram centrifugadas (130g, 10 minutos, 25 °C), lavadas com NaCl 0,15 mol/L, e em seguida suspensas em solução de HBSS (pH 7,2) com 2% de soro bovino fetal (SBF). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão com o corante azul de Tripan. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade foi analisada por meio da exclusão do corante azul de Tripan. A porcentagem média de pureza obtida foi de cerca de 96% e a viabilidade, de 98%.

3.4.2.1.3. Obtenção dos neutrófilos através do Método do Monopólio: Os neutrófilos foram colhidos através de punção venosa com sistema a vácuo em tubo com heparina como

anticoagulante. O sangue colhido foi adicionado a tubos falcon de 15 mL contendo reagente Monopólio e centrifugado (700g, 40 minutos, 25 °C). As camadas contendo o plasma e as células mononucleares foram descartadas e a parte contendo os granulócitos foi transferida para tubos de fundo redondo, diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (270g, 10 minutos, 25 °C). As hemácias remanescentes foram lisadas com NH₄Cl 0,83% (pH 7,2) por 5 minutos. As células foram centrifugadas (130g, 10 minutos, 25 °C), lavadas com NaCl 0,15 mol/L, e em seguida suspensas em solução de HBSS (pH 7,2) com 2% de SBF. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão com o corante azul de Tripan. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade foi analisada por meio da exclusão do corante azul de Tripan. A porcentagem média de pureza obtida foi de cerca de 98% e a viabilidade, de 98%.

3.5. Avaliação do efeito de derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, estimulados via receptores Fc, por meio de Imunocomplexos Precipitados formados de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, e F(ab')₂-OVA/SHN; e Imunocomplexos imobilizados formados de IgG-OVA; além do estímulo solúvel PMA:

3.5.1. Preparo de Placas de 96 poços, próprias para leitura de Quimioluminescência (QL), com Imunocomplexos imobilizados formados de IgG-OVA:

Placas de 96 poços, próprias para a realização da QL, foram preparadas com IC imobilizados, conforme metodologia de Jakus, et. al., 2008. Para isso, uma solução de 1 mg/mL de Ovoalbumina (OVA) diluída 1:2 em tampão carbonato/bicarbonato (0,5 mol/L, pH 9,6), foi adicionada aos poços. A placa foi mantida por 16 horas na geladeira. Na sequência, os poços foram lavados com PBS, bloqueados com uma solução de PBS com 2% de albumina de soro bovino (BSA, da sigla em inglês) por 1 hora. Para formar os IC, foi adicionado IgG anti-OVA (1:2 em PBS) aos poços e mantido por 90 minutos. Após esse período os poços foram lavados com PBS e a placa foi armazenada na geladeira até o momento do uso.

3.5.2. Quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina de neutrófilos humanos estimulados:

O metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos desencadeados por diferentes estímulos, foi avaliado através da medida da produção de O₂[•] por meio da quimioluminescência (QL) dependente de lucigenina (QLluc), e da produção total de Espécies Reativas de Oxigênio por

QL dependente de luminol (QLlum), conforme metodologia adaptada de Lucisano-valim et al., 2002. Para esse experimento, os neutrófilos foram obtidos através do Método da Gelatina. Em placas de 96 poços, foram adicionados os neutrófilos (1×10^6 mL), o derivado 3-fenilcumarínico C13 em diferentes concentrações, o DMSO (0,1% - controle solvente); e as sondas quimioluminescentes luminol (100 $\mu\text{mol/L}$) ou lucigenina (100 $\mu\text{mol/L}$). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foram adicionado os diferentes estímulos IC precipitados: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN (60 $\mu\text{g/ml}$) e também PMA (10^{-7} mol/L) a cada poço para estimular as células e, imediatamente, foi medida a QL durante 15 minutos a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha). Nos experimentos utilizando Imunocomplexos imobilizados, as células foram incubadas com os referidos tratamentos por 3 minutos e em seguida transferidas para placas com IC imobilizados formados de IgG-OVA. e imediatamente após a transferência foi feita a leitura da QL. A partir dos perfis cinéticos de QL, que serviram para determinar a porcentagem de inibição promovida pelas diferentes concentrações das substâncias estudadas, foram calculados os valores de área integrada.

Figura 3.2. Representação das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade do derivado 3-fenilcumarínico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. **A:** Medida de quimioluminescência (QL) em função do tempo, produzida por neutrófilos estimulados com IC, na presença de DMSO (controle) ou de seis concentrações da substância-teste. **B:** Representação da área integrada de QL (área sob a curva), cujos valores são determinados para cada amostra (**gráfico C**) e posteriormente utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição da QL de cada concentração em relação ao controle (**gráfico D**). **E:** cálculo do valor de IC_{50} de cada substância avaliada, por meio de regressão não linear. [Adaptado de KABEYA (2006)].

3.6. Avaliação da interação entre o derivado 3-fenilcumarínico C13 e a enzima mieloperoxidase humana (MPO) por *docking*:

Os cálculos de docking foram realizados com o programa AutoDock Vina (Trott, et. al., 2010), com volume de busca focado no sítio ativo da cadeia A da estrutura cristalográfica da mieloperoxidase humana [(código no Protein data bank (PDB): DB: ID 4C1M)] (Forbes, et. al., 2013). Devido à natureza estocástica do método, para cada *docking* independente foram realizadas 1000 repetições. Para validar o método, foram utilizados os compostos HX1e aminobenzoidrazida (ABAH), inibidores não-covalentes da MPO. Para efeito de comparação foi utilizado o composto fenólico quercetina.

O hardware utilizado foi composto de 4 máquinas virtuais hospedadas na intra-estrutura de computação em nuvem da Universidade de São Paulo, totalizando 32 núcleos de processamento.

3.7. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de fagocitose de Imunocomplexos (IC) por neutrófilos humanos:

A técnica de fagocitose foi realizada por citometria de fluxo de acordo com Sahlin, et al., 1983 e Hed, 1986 com adaptação de (Oliveira, Machado e Pessine, 2005). Neutrófilos (1×10^6 mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 μ M, DMSO (0,1% - controle solvente), citocalasina D (10 μ M - controle positivo) ou HBSS com 0,1% de gelatina a 37° C por 30 minutos. Ovoalbumina (OVA) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi preparada de acordo com o método descrito por Clark e Shepard (1963). Foi adicionado nos tubos diferentes tipos de IC (IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN), seguindo-se a incubação a 37° C por mais 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas (200g, 4° C, 10 minutos). Ao fim da lavagem as células foram suspensas em 200 μ L de PBS gelado e analisadas imediatamente em citômetro de fluxo (FACSCanto - software DIVA – Becton Dickinson, CA, EUA) na presença de azul de tripan (1,8 mg/mL). A análise das amostras foi realizada com base em 10.000 eventos.

3.7.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a Expressão do receptor de adesão e ativação celular (CD11b/CD18) de neutrófilos humanos:

A expressão do receptor CD11b/CD18 foi avaliada de acordo com (Suri *et al.*, 2008). Os neutrófilos, obtidos através do Método do Ficol-Histopaque, foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 μ mol/L, DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 2% de SBF por 30 minutos (5% de CO₂, 37°C). Em seguida, as células foram estimuladas com PMA 10^{-7} mol/L por 5 minutos. As células foram marcadas com IgG1-PE anti-CD11b (CR3; Mac clone ICRF 44; IgG1 κ pa), que se liga no CD11b na forma total; IgG1-FITC anti-CD11b (clone CBRM 1/5; IgG1 κ pa), que reconhece a forma ativa do CD11b; ou isotipo controle (IgG1 κ pa) por 30 minutos. Após a interrupção da reação com PBS gelado, as células foram lavadas, fixadas e analisadas usando-se citometria de fluxo.

3.8. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de desgranulação de neutrófilos humanos estimulados com fMLP e Imunocomplexo (IC) imobilizado:

Descrito por Johansson e colaboradores, 2002 e modificado por (Kanashiro *et al.*, 2004) este ensaio avalia a atividade da enzima elastase através da utilização do substrato incolor *succinil-Ala-Ala-Val-p-nitroanilida* (SAAVNA), que na presença desta enzima é degradado no produto de coloração amarela, *p-nitroanilina* (p-NA), o qual passa a ser quantificado espectrofotometricamente a 405 nm. Este método permitiu avaliar o efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a atividade da elastase em ensaios com células, e em ensaios com a enzima previamente isolada.

3.8.1. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com fMLP após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico:

Alíquotas de neutrófilos (1×10^6 mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram incubadas (37°C, 10 min) com 1 $\mu\text{mol/L}$ de citocalasina B e as diferentes concentrações dos derivado 3-fenilcumarínico (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou solução de HBSS com gelatina a 0,1% (controle positivo). Posteriormente, foi adicionado 1 $\mu\text{mol/L}$ do estímulo *fMLP* e as amostras foram incubadas (30 min a 37°C). Após incubação os tubos foram centrifugados (700g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante colhido. Ao sobrenadante foi adicionado o substrato SAAVNA (1 mmol/L) e, imediatamente após a adição (tempo zero), foi realizada a leitura espectrofotométrica em 405 nm. O sistema foi mantido a 37°C e novas leituras foram realizadas a cada 10 minutos durante o período de meia hora. Como controle negativo, foi medida a atividade da enzima liberada na ausência de estímulo (apenas células e tampão). Para corrigir possíveis interferências da substância estudada nas leituras, foram feitos “brancos” contendo o derivado 3-fenilcumarínico nas diferentes concentrações juntamente com os demais compostos da reação exceto o substrato SAAVNA, o qual foi substituído pelo seu solvente (DMSO). Os valores de absorvância obtido nestes poços foram subtraídos dos valores de absorvância das respectivas amostras.

3.8.2. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com Imunocomplexo Imobilizado após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico:

Alíquotas de neutrófilos (2×10^6 mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram incubadas (37°C, 10 min) com 1 $\mu\text{mol/L}$ de citocalasina B e o derivado 3-fenilcumarínico nas

concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente) ou solução de HBSS com gelatina a 0,1% (controle positivo). Posteriormente, as células incubadas com os referidos tratamentos, foram transferidas para placas de 96 poços que possuíam uma camada de imunocomplexos imobilizados, formados de IgG-OVA, e incubadas (30 min a 37°C). Após incubação a placa foi centrifugada (700g, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante colhido. Ao sobrenadante foi adicionado o substrato SAAVNA (1 mmol/L). Após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 405 nm. O sistema foi mantido a 37°C. Como controle negativo, foi medida a atividade da enzima liberada na ausência de estímulo (apenas células e tampão). Para corrigir possíveis interferências das substância estudada nas leituras, foram feitos “brancos” contendo o derivado 3-fenilcumarínico nas diferentes concentrações juntamente com os demais compostos da reação exceto o substrato SAAVNA, o qual foi substituído pelo seu solvente (DMSO). Os valores de absorvância obtido nestes poços foram subtraídos dos valores de absorvância das respectivas amostras. As placas com IC imobilizados foram preparadas conforme o item 3.9.1.

3.8.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade da enzima elastase previamente isolada de neutrófilos humanos:

Primeiramente foi promovida a desgranulação dos neutrófilos. Para isso, os neutrófilos (1×10^6 células/mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram incubados com 1 $\mu\text{mol/L}$ de citocalasina B (10 min, 37°C), e posteriormente foi adicionado 1 $\mu\text{mol/L}$ de fMLP. Simultaneamente, foi feito o controle negativo contendo apenas células e tampão. Após incubação (30 min, 37°C), foi realizada centrifugação (755 x g, 10 min) e o sobrenadante foi separado para a utilização nos ensaios.

Alíquotas do sobrenadante contendo a enzima foram adicionadas a diferentes concentrações do derivado 3-fenilcumarínico (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO 0,1% (controle solvente), ou solução de HBSS com gelatina a 0,1% (controle positivo). O controle negativo foi realizado com o sobrenadante do tubo contendo as células não estimuladas juntamente com o tampão. O substrato SAAVNA (1 mmol/L) foi adicionado e iniciou-se a leitura da absorvância (tempo zero) em 405 nm. As amostras foram mantidas a 37°C e foram realizadas novas leituras a cada 10 minutos durante o período de meia hora. Da mesma forma que no ensaio anterior foram feitos “brancos” para cada concentração de C13.

3.9. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a atividade microbica de neutrófilos humanos na presença de *Candida albicans*:

Esse ensaio foi realizado de acordo com (Twentyman e Luscombe, 1987). Em tubos contendo suspensões de neutrófilos (1×10^6 mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram adicionados o derivado 3-fenilcumarínico nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente), ou HBSS com 0,1% de gelatina (controle negativo). Após incubação (37°C , 15 min), foi adicionada uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 64548) ($0,6 \times 10^6$ UFC/mL) e as células foram mantidas sob agitação (37°C , 133 rpm, 2 horas). Após centrifugação ($220 \times g$, 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 solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (0,5 mg/mL em tampão de RPMI), seguido de incubação (37°C , 4 h, 133 rpm) ao abrigo da luz. As leveduras viáveis são capazes de reduzir o MTT, formando o metabólito insolúvel formazan, o qual possui coloração roxa e precipita no interior das células. Desta forma, a viabilidade da *C. albicans* pode ser considerada proporcional à leitura de absorvância das amostras a 545 nm. Após centrifugação ($220 \times g$, 5 min) foi adicionado DMSO para solubilizar o formazan 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 HBSS contendo gelatina a 0,1% (controle positivo) e com as duas concentrações do derivado 3-fenilcumarínico (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$) 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. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre o influxo e a mobilização de cálcio de neutrófilos humanos estimulados com fMLP e IC precipitado formado de IgG-OVA:

Para a realização desse ensaio, os neutrófilos humanos foram obtidos através do Método do Ficol-Histopaque. Primeiramente, as células foram incubadas com a sonda fluorescente FLUO-3AM (30 minutos, 37°C), de acordo com metodologia de Kao, et. al., 2010. Após esse período, o excesso de sonda que não penetrou nas células foi removido por centrifugações e lavagens e em seguida as células foram mantidas no gelo até a realização do experimento. Em placas de 96 poços próprias para fluorescência, foram adicionadas as células carregadas com o FLUO 3-AM e incubadas com o derivado 3-fenilcumarínico nas concentrações de 1 e 20

$\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente), solução de HBSS com 2% de SBF (controle positivo) ou verapamil (1 $\mu\text{mol/L}$) - inibidor dos canais de cálcio. Foi realizada a leitura da fluorescência basal, isto é, a fluorescência da célula antes que a mesma fosse incubada com os estímulos. Os estímulos utilizados foram o fMLP (10^{-7} mol/L) e o IC formado de IgG-OVA/SHN (120 $\mu\text{g/ml}$). Imediatamente após a adição dos estímulos, foi realizada a leitura da Fluorescência durante 30 minutos.

Para realizar o Cálculo da concentração de cálcio foi utilizado a seguinte equação matemática:

$$\text{Ca}^{2+} = Kd \times \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

Onde:

Ca^{2+} : concentração de cálcio em nmol/L

Kd: constante de dissociação do cálcio (específico para cada sonda e temperatura; para Fluo 3-AM, é utilizado o valor de 864 nM a 37°C).

F: fluorescência da amostra

$F_{\max}$: fluorescência máxima

$F_{\min}$: fluorescência mínima

Para calcular a $F_{\min}$ foi utilizada a autofluorescência da célula, isto é, a fluorescência da célula não marcada com a sonda FLUO 3-AM. O parâmetro da $F_{\max}$ foi determinado medindo-se a fluorescência da célula marcada, estimulada com 10 $\mu\text{mol/L}$ de ionóforo de cálcio A23187. Além de expressar os dados na forma de concentração de cálcio, representamos também na forma de variação de fluorescência, isto é, a diferença entre a fluorescência antes e após a adição do estímulo; e variação da concentração de cálcio, isto é, a diferença entre a concentração de cálcio antes e após a adição do estímulo.

3.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados com fMLP:

3.11.1. Análise qualitativa da polimerização do Citoesqueleto por meio de Microscopia Confocal:

Esse ensaio foi realizado de acordo com Aulakh, et. al., 2014. Para a realização desse ensaio, lamínulas de vidro foram tratadas com 50 µL de soro humano autólogo fresco (1 hora, 37°C), a fim de promover a aderência dos neutrófilos às mesmas. As células foram obtidas através do Método do Monopólio e incubadas com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (20 µmol/L), DMSO (0,1% - controle solvente), DPI (50 µmol/L), citocalasina B (10 µmol/L) ou solução de HBSS com 2% de SBF (controle positivo) por um período de 1 hora (5% de CO₂, 37°C) para facilitar o processo de adesão às lamínulas. Após essa etapa, os neutrófilos foram estimulados com fMLP 10⁻⁶ mol/L por 1 minuto. A reação foi finalizada pela adição de paraformaldeído 4%. As células foram permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 por 10 minutos e realizou-se o bloqueio com 1% de BSA por 30 minutos.

Para a visualização do citoesqueleto em microscopia confocal, foi utilizado Faloidina marcada com rodamina. As células foram incubadas por 20 minutos com o referido composto e as lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem ProLong Gold que possui o corante para material genético DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As imagens foram obtidas por meio do Microscópio Confocal (Leica Microsystems) e analisadas através do Software Leica Application Suite (Thermo Fisher Scientific).

Para a mensuração da fluorescência arbitrária, as imagens foram processadas no Software ImageJ.

3.12. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre o processo de formação de Redes extracelulares de Neutrófilos (NETs):

3.12.1. Análise qualitativa da formação e liberação das NET por meio de Microscopia Confocal:

Esse ensaio foi realizado de acordo com Tibrewal, et., al. 2014, com modificações. Para a realização desse ensaio, lamínulas de vidro foram tratadas com poli-L-lisina a fim de promover a aderência dos neutrófilos às mesmas. As células foram obtidas através do Método do Ficol-Histopaque e incubadas com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 µmol/L, DMSO (0,1% - controle solvente), solução de HBSS com 2% de SBF (controle positivo) ou DPI (1 µmol/L - controle negativo) por um período de 1 hora (5% de CO₂, 37°C) para facilitar o processo de adesão às lamínulas. Após essa etapa, os neutrófilos foram estimulados com PMA 10⁻⁷ mol/L e mantidos em condições de cultura celular (5% de CO₂, 37°C) por um período de 4 horas. Na sequência, as células foram fixadas com 4% de

paraformaldeído, permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 por 1 minuto e realizado o bloqueio com 3% de BSA por 1 hora.

Para a visualização das NET em microscopia confocal, foi utilizado anticorpo primário específico para a elastase humana (anti-neutrophil elastase antibody ab21595 - Rabbit policlonal IgG). As células foram incubadas *overnight* com o referido anticorpo e logo depois de marcadas com o anti-IgG (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L - Alexa Fluor 647). As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem ProLong Gold que possui o corante para material genético DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As imagens foram obtidas por meio do Microscópio Confocal (Leica Microsystems) e analisadas através do Software Leica Application Suite (Thermo Fisher Scientific).

3.12.2. Análise quantitativa da formação e liberação das NET:

As células foram obtidas através do Método do Ficol-Histopaque e incubadas com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente), solução de HBSS com 2% de SBF (controle positivo) ou DPI (1 $\mu\text{mol/L}$ - controle negativo) por um período de 1 hora (5% de CO_2 , 37°C). Após essa etapa, os neutrófilos foram estimulados com PMA 10^{-7} mol/L e mantidos em condições de cultura celular (5% de CO_2 , 37°C) por um período de 4 horas. Ao final do período de incubação, foi adicionado 0,5 U/mL de DNase (10 minutos, 37°C). A seguir, adicionou-se 10 mmol/L de EDTA para paralisar a atividade da enzima. As amostras foram centrifugadas (700 g, 10 minutos), o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C para posterior quantificação do DNA liberado. O DNA foi quantificado por meio de fluorescência, utilizando-se o Kit Picogreen.

3.13. Investigação do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre neutrófilos humanos

3.13.1. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo:

Este ensaio foi realizado de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante do Kit Trevigen R & D. Neutrófilos (1×10^6 cel/ml), obtidos através do Método do Ficol-Histopaque, foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, CD95 (controle positivo) (10 $\mu\text{mol/L}$), DMSO 0,1% (controle solvente) ou HBSS com 2% de SBF durante os tempos de 6 e 12 horas. Para isso as células foram mantidas em tubos de citometria sob condições de cultura em câmara de CO_2 (5%) a 37 °C. Após o período de incubação, as

célula foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 100 µl do reagente de incubação, contendo o do tampão de ligação, a Anexina V-APC e o Iodeto de Propídio (PI), diluídos em água milli-Q. Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida foi adicionado o tampão de ligação e feita imediatamente à aquisição das amostras em citometria de fluxo (Citômetro de Fluxo FACSCanto – Becton Dickinson, CA, EUA). A análise foi realizada com base em 10.000 eventos.

3.13.2. Análise da alteração do conteúdo de DNA:

A análise da alteração do conteúdo de DNA foi realizada conforme metodologia descrita por Nicolletti et al., 1991. Os neutrófilos (1×10^6 ml), obtidos através do Método do Ficol-Histopaque, foram tratados ou não com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 µmol/L, DMSO 0,1% (controle solvente) ou HBSS com 2% de SBF. As células foram mantidas em cultura por diferentes períodos (6, 12 e 18h) a 37°C em câmara contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 200g por 10 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µl de tampão Citrato, contendo Triton 0,1% e PI 50µg/ml. Após essa etapa as amostras foram incubadas no escuro overnight a 4°C. A aquisição das amostras foi realizada em citometria de fluxo (FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise foi realizada com base em 10.000 eventos

3.13.3. Análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Lucisano-valim et al., 2002. Neutrófilos (1×10^6 mL), obtidos através do Método do Ficol-Histopaque, foram incubados com o derivado 3-fenilcumarínico na maior concentração em estudo (20 µmol/L), Triton X-100 (0,2%; v/v - controle positivo), DMSO; (0,1%; v/v - controle solvente) ou HBSS com 2% de SBF, por um período de 18 horas em condições de cultura, 5% de CO₂ a 37°C. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas (970g, 10 minutos, 4°C), possibilitando a separação entre o sobrenadante e o sedimento de células.

O sedimento foi suspenso em HBSS com 2% de SBF e uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume do corante azul de Tripán (0,1% em NaCl 0,15 mol/L). A porcentagem de células viáveis foi avaliada a partir da contagem de 200 células, em microscópio óptico (modelo BX51, Olympus, Tóquio, Japão) (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). Ao reagente de trabalho, que é composto de piruvato, NADH e tampão, foi adicionada uma alíquota do sobrenadante, e a absorvância foi mensurada em 340 nm durante 3 minutos a 37°C, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão) (Kabeya, 2002). A atividade enzimática da LDH foi calculada conforme instruções do fabricante do kit.

3.13.4. Análise da expressão dos receptores de membrana CD62L e CD64, relacionados com o nível de ativação celular de neutrófilos: A expressão dos receptores relacionados com o estágio de ativação dos neutrófilos foi avaliado de acordo com (Suri *et al.*, 2008). Os neutrófilos, obtidos através do Método do Ficol-Histopaque, foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente ou HBSS suplementado com 2% de SBF. As células foram mantidas em cultura, pelos períodos de 0, 6 e 12 horas (5% de CO_2 , 37°C). Elas foram marcadas com anticorpos IgG1-PE anti-CD62L (IgG1 κ pa), e anti-CD64 (IgG1 κ pa) ou isotipo controle (IgG1 κ pa) por 30 minutos. Após a interrupção da reação com PBS gelado, as células foram lavadas, fixadas e analisadas usando-se citometria de fluxo.

3.14. Avaliação do potencial efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*:

3.14.1. Recrutamento *in vitro* de neutrófilos humanos, na presença do derivado 3-fenilcumarínico C13, por meio de câmara de Boyden: Neutrófilos (1×10^6 mL), obtidos através do Método da Gelatina, foram tratados com o derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS com 0,1% de gelatina por 30 minutos (5% de CO_2 , 37°C). Em seguida, as células foram expostas aos estímulos quimioatraentes fMLP (10^{-6} M), IL-8 (20 ng/mL), LTB₄ (10^{-6} M) por um período de 1 hora (5% de CO_2 , 37°C) em Câmara de Boyden equipada com membrana. Após esse período, as membranas foram removidas, fixadas e coradas e os neutrófilos que migraram através da membrana foram contados ao microscópio óptico, em pelo menos cinco campos aleatoriamente selecionados. Cada amostra foi medida em triplicata. Essa metodologia foi adaptada de Souto *et. al.*, 2011.

3.14.2. Expressão de receptores de recrutamento (BLT1 e FLRP1) de neutrófilos humanos incubados com o derivado 3-fenilcumarínico C13:

A expressão dos receptores envolvidos no processo de diapedese dos neutrófilos foi avaliada de acordo com (Souto *et al.*, 2011). Os neutrófilos, obtidos através do Método da Gelatina, foram incubados com os derivado 3-fenilcumarínico C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS com 0,1% de gelatina por 30 minutos (5% de CO_2 , 37°C). Em seguida, as células foram estimuladas com PMA (10^{-7} mol/L) por 30 minutos (5% de CO_2 , 37°C). Decorrido esse período, as células foram marcadas com anticorpos IgG1-FITC anti-BLT1 (IgG1 κ pa), anti-FLPR1 (IgG1 κ pa) ou isotipo controle (IgG1 κ pa) por 30 minutos. Após a interrupção da reação com PBS gelado, as células foram lavadas, fixadas e analisadas usando-se citometria de fluxo.

3.15. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos:

3.15.1. Preparo dos lipossomas e caracterização físico-química das vesículas

O preparo de lipossomas unilamelares livres foi feito empregando-se o método descrito por (Batzri e Korin, 1975), modificado por (Oliveira, Machado e Pessine, 2005). Brevemente, consistiu na injeção controlada (1-3 $\mu\text{L/s}$) de uma solução etanólica de lipídeos contendo 750 μL de fosfatidilcolina hidrogenada de soja e colesterol na proporção de massa de 5:1 usando uma seringa de 1 mL de insulina em excesso de solução aquosa de NaCl a 0,9% sob agitação e a temperatura de 55°C, acima da temperatura de transição de fase do fosfolípideo empregado. Os lipossomas livres obtidos foram purificados por ultracentrifugação a 100.000 g por 2h a 4°C (Beckman XL-70, USA).

A caracterização físico-química das vesículas lipídicas obtidas foi feita em colaboração com o laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, da FCFRP-USP. (As determinações do diâmetro e do potencial zeta das partículas foram realizadas utilizando-se medidas de espalhamento de luz (Laser Light Scattering) no aparelho Zeta Sizer Nano Series, Nano-ZS, da Malvern Instruments) a temperatura de 25°C. Amostras foram analisadas após 24 horas da preparação.

Para medidas do tamanho da partícula, a intensidade da luz laser espalhada foi detectada em ângulo de 173° com um fotomultiplicador, índice de refração de 1,330 e viscosidade, 0,8872 cP. O índice de polidispersão foi utilizado como medida da faixa de distribuição de tamanho das vesículas.

Para determinação da carga de superfície dos lipossomas, cerca de 2 mL de cada suspensão lipossomal foi adicionada na célula eletroforética e o potencial zeta foi determinado pelas medidas da Mobilidade Eletroforética (μ). A mobilidade foi convertida em potencial pela equação de Smoluchowski, $Z = \mu\eta/\epsilon$, onde η é a viscosidade e ϵ é a permissividade da solução.

3.15.2. Incorporação do derivado 3-fenilcumarínico C13 nas vesículas lipossomais:

O derivado 3-fenilcumarínico C13 foi dissolvido na solução etanólica de lipídeos. O preparo destes lipossomas contendo o composto seguiu o mesmo protocolo descrito no item anterior. Lipossomas foram separados do material não encapsulado por ultracentrifugação a 100.000 xg a 4°C por 2 horas (Beckman XL-70, USA). O sedimento contendo LUV foi suspenso em solução aquosa de NaCl a 0,9% e depois dissolvido pela adição de etanol. A quantidade de C13 encapsulada foi determinada por espectrofotometria UV-vis (espectrofotômetro DU-70, Beckman) em comprimento de onda específico para a C13 (375 nm) e curva de calibração da C13 livre em etanol (1-50 μ mol/L). A porcentagem de incorporação da C13 foi calculada empregando-se a seguinte equação: $EI = Q_p/Q_t \times 100$, onde EI é a eficiência de incorporação (em porcentagem), Q_t a quantidade teórica de C13 adicionada à solução de lipídeos e Q_p é a quantidade de C13 detectada no sedimento após suspensão em NaCl a 0,9% e dissolução em etanol.

A caracterização físico-química dos lipossomas contendo a C13 seguiu o mesmo protocolo descrito no item anterior.

3.15.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos, estimulados via receptores Fc γ utilizando Imunocomplexo precipitado formado de IgG-OVA: O metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados foi avaliado através da medida da quimioluminescência (QL) conforme descrito no item 3.9.

3.16. Avaliação do derivado 3-fenilcumarínico C13, incorporado em lipossomas, em Modelo animal de Artrite induzida por zimosan:

3.16.1. Animais utilizados no estudo: Os experimentos foram conduzidos com ratos Wistar machos de aproximadamente 180 a 220 g fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ao todo foram utilizados 90 animais, sendo que

por grupo de tratamento foram usados 15 animais. Eles foram mantidos à temperatura de aproximadamente 25°C, ciclo claro/escuro 12/12 horas, com alimento e hidratação *ad libitum* até o momento do procedimento experimental, em que foram privados apenas de alimento, no biotério da FCFRP.

3.16.2. Procedimentos éticos: Todos os procedimentos utilizados foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FCFRP-USP (protocolo - 15.1.333.60.0 (ver anexo 2).

3.16.3. Tratamento dos animais: Os animais foram tratados, 1 hora antes da indução da inflamação articular, com o derivado 3-fenilcumarínico C13 (1,5 mg/kg), o flavonoide quercetina (1,5 mg/kg) ou o DMSO (solvente), incorporados em lipossomas; ou a dexametasona (4 mg/Kg) ou NaCl 0,9%, na forma livre. Para isso foi necessário preparar os lipossomas, incorporando as referidas substâncias nos mesmos e caracterizá-los físico e quimicamente. O preparo de lipossomas unilamelares livres foi feito de acordo com os itens 3.18.1 e 3.18.2. Os animais foram tratados de forma intraperitoneal.

3.16.4. Indução local da artrite: A metodologia utilizada nesse estudo foi descrita por Keystone 1997 e adaptada por (Kanashiro *et al.*, 2009). Após analgesia, os ratos foram submetidos à injeção intra-articular de zymosan (de volume total, contendo 300 µg de zymosan diluído em 50µL de NaCl 0,9%). Animais controle receberam somente NaCl 0,9%.

3.16.5. Parâmetros inflamatórios avaliados: Decorrido 6 horas da indução da inflamação intra-articular, os animais foram eutanasiados por decapitação, o líquido sinovial e o sangue total foram coletados. Os parâmetros inflamatórios avaliados foram: edema da articulação, por meio da medida do diâmetro transversal da articulação antes e após a indução da inflamação; número de células totais e de neutrófilos que migraram para o processo inflamatório, por meio da contagem de células em câmara de Neubauer, e a quantidade de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), por meio de ELIZA. Esses dois últimos parâmetros foram mensurados no líquido sinovial.

3.17. Análise de dados

Os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 7.00. Foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais, sendo estas consideradas significantes quando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fcγ e/ou CR, utilizando diferentes tipos de IC precipitados formados de: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN, e também o estímulo solúvel PMA.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, o derivado 3-fenilcumarínico (C13) inibiu o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelhos estimulados com imunocomplexos (IC) de forma mais eficiente do que o flavonoide Quercetina. Essa substância também foi capaz de interagir de maneira similar à Quercetina com o sítio ativo da enzima HRP (*horseradish peroxidase*) por meio de análises de Modelagem Molecular através de *docking* (Kabeya, et. al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que a C13 é capaz de inibir a enzima mieloperoxidase humana, através de ensaios biológicos com a enzima isolada (Andrade, et. al., 2013). Dessa forma, dando continuidade ao entendimento do efeito biológico do derivado 3-fenilcumarínico sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, foram realizados ensaios de quimioluminescência (QL) utilizando as sondas luminol (QLlum) e lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados com diferentes tipos de IC e estímulo solúvel (PMA). Nos ensaios de QLlum, na ausência de tratamento das células com o derivado 3-fenilcumarínico, foi obtido um padrão de resposta que pode ser visto no Apêndice 1.

Em todos os ensaios aqui realizados, as concentrações empregadas da C13 não apresentaram efeito tóxico para as células (Andrade *et al.*, 2013). A C13 apresentou efeito inibitório da quimioluminescência, produzida pelos neutrófilos humanos quando ativados via diferentes estímulos. As figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 mostram perfis de QLlum e QLluc, referente a um experimento para os diferentes estímulos. Avaliou-se o efeito da C13 em diferentes concentrações no intuito de verificar se o efeito inibitório na QLlum e na QLluc é dependente de concentração. Nas figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 pode-se verificar os valores de área integrada referente à QLlum e QLluc de todos os experimentos realizados em diferentes concentrações do derivado 3-fenilcumarínico, com os diferentes estímulos, mostrando que a C13 apresentou um efeito inibitório da QL dependente da concentração, como pode ser visto também pelos valores de porcentagem de inibição nas figura 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4.

Figura 4.1: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados via FcγR por meio de IC precipitado formado de IgG-OVA: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 (0,02 – 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC precipitado formado de IgG-OVA (60 $\mu\text{g/ml}$), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum e QLluc com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum e QLluc; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum e QLluc calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. **Abreviaturas:** E: espontâneo; **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

Figura 4.2: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados via Fc γ R e CR3 por meio de IC precipitado formado de IgG-OVA opsonizado com SHN: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 (0,02 – 20 μ mol/L), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram estimuladas com IC precipitado formado de IgG-OVA/SHN (60 μ g/ml), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro de placa. **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum e QLluc com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum e QLluc; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum e QLluc calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. **Abreviaturas:** E: espontâneo; **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina. **SHN:** soro humano normal.

Figura 4.3: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados via CR3 por meio de IC precipitado formado de F(ab')₂-OVA opsonizado com SHN: Neutrófilos (1x10⁶ ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 (0,02 – 20 µmol/L), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram estimuladas com IC precipitado formado de F(ab')₂-OVA/SHN (60µg/ml), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum e QLluc com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum e QLluc; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum e QLluc calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. **Abreviaturas:** E: espontâneo; **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina. **SHN:** soro humano normal.

Figura 4.4: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados com PMA: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (3 min, 37°C) com C13 (0,02 – 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. As células foram estimuladas com PMA (10^{-7} mol/L), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro. **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum e QLluc com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum e QLluc; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum e QLluc calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas. **Abreviaturas:** E: espontâneo; QLlum: quimioluminescência dependente de luminol; QLluc: quimioluminescência dependente de lucigenina.

A análise do efeito inibitório da C13, em diferentes concentrações, possibilitou calcular o CI_{50} , isto é, a concentração do derivado 3-fenilcumarínico necessária para inibir 50% da QLlum ou QLluc. A porcentagem de inibição da QLlum pelo derivado 3-fenilcumarínico **C13** obedeceu a seguinte ordem, de acordo com o tipo de estímulo: $0,80 \pm 0,21$ (PMA) $< 1,05 \pm 0,16$ (IgG-OVA) $< 1,40 \pm 0,09$ [F(ab')₂-OVA/SHN] $< 2,06 \pm 0,23$ (IgG-OVA/SHN). Já para a QLluc, o padrão de inibição foi: $1,28 \pm 0,05$ (IgG-OVA) $< 1,84 \pm 0,29$ (PMA) $< 2,22 \pm 0,2$ (IgG-OVA/SHN) $< 3,01 \pm 0,36$ [F(ab')₂-OVA/SHN]. Os valores de CI_{50} e a análise estatística para esse ensaio podem ser vistos na Tabela 4.1. O efeito inibitório da C13 na QLlum foi significativamente maior do que na QLluc.

Tabela 4.1: Inibição da QLlum e da QLluc pelo derivado 3-fenilcumarínico C13, representado pelo valor de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$), para neutrófilos humanos estimulados com diferentes tipos de imunocomplexos precipitados e também com o estímulo solúvel PMA.

	IgG-OVA		IgG-OVA/SHN		F(ab')-OVA/SHN		PMA	
	QLlum	QLluc	QLlum	QLluc	QLlum	QLluc	QLlum	QLluc
C13	$1,05 \pm 0,16^{a, f}$	$1,28 \pm 0,05^a$	$2,06 \pm 0,23^b$	$2,22 \pm 0,20^b$	$1,40 \pm 0,09^c$	$3,01 \pm 0,36^d$	$0,80 \pm 0,21^f$	$1,84 \pm 0,29^e$

(a) Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** valores com letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

4.2. Análise da interação do derivado 3-fenilcumarínico C13 com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase (MPO) humana através de *docking*:

A fim de avaliar se o derivado 3-fenilcumarínico C13 seria capaz de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase humana (MPO), interagindo com o sítio ativo da mesma, foram realizados experimentos utilizando cálculos de *docking* molecular.

A única estrutura cristalográfica da MPO humana em complexo com um inibidor não-covalente, o composto HX1, foi usada para validar o protocolo computacional (PDB ID 4C1M) (Forbes, et. al., 2013). A estrutura cristalográfica foi reproduzida via *docking* e o mesmo protocolo foi usado para o inibidor não-covalente ABAH, a quercetina e a C13.

Os resultados de docking mostraram que os dois inibidores não-covalentes da MPO já conhecidos e que não tem atividade “scavenger”, HX1 e ABAH, inibem a MPO através do estabelecimento de ligações de hidrogênio com os resíduos glicina 91 (Gln-91), histidina 95 (His-95) e argila 239 (Arg-239) do sítio ativo da enzima (ver figuras 4.5a e 4.5b). No caso do inibidor HX1, há também uma ligação de hidrogênio estabelecida com o heme que é mediada por uma molécula de água do meio (ver figura 4.5a). A C13 conseguiu estabelecer ligações de hidrogênio com os mesmos resíduos que os inibidores padrão da MPO (HXI e ABAH), assim como a quercetina (ver figuras 4.5c e 4.5d). Esses dados, em conjunto com o conhecido envolvimento de tais resíduos no mecanismo catalítico da MPO, possibilita mostrar que a C13 tem capacidade de inibir a MPO diretamente através de interação no sítio ativo da MPO.

Fig. 4.5: Avaliação da interação do derivado 3 fenilcumarínico com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase humana (MPO) por meio de *docking*: a) interação do HX1 com a MPO; b) interação do ABAH com a MPO; c) interação da quercetina com a MPO; d) interação da C13 com a MPO. Os átomos de hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, flúor e ferro estão representados nas cores branco, azul, vermelho, azul claro e laranja, respectivamente. Os carbonos do grupo heme, MPO e ligantes estão representados nas cores cinza claro, cinza escuro e verde, respectivamente. Todos os átomos, exceto ferro, estão mostrados em sticks. O átomo de ferro está representado como esfera. As ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas pontilhadas.

4.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na fagocitose, de diferentes tipos de Imunocomplexos precipitados, por neutrófilos humanos:

Os neutrófilos, assim como as células dendríticas e os macrófagos, são considerados fagócitos profissionais (Rabinovitch, M. 1995). O processo de fagocitar partículas ou componentes dos agentes infecciosos, é um evento essencial para que essas células executem as suas funções de reconhecer e eliminar os patógenos. Como a C13 interferiu na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por neutrófilos estimulados através de diferentes tipos de imunocomplexos, e a fagocitose é evento ativo que envolve diretamente o citoesqueleto da célula que por sua vez é influenciado pelo status redox da mesma (Sakai, et. al., 2012), avaliou-se o efeito da C13 na atividade fagocítica dos neutrófilos. Através da fagocitose de diferentes imunocomplexos formados de: IgG-OVA; IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN - (OVA marcada com FITC) - foi possível analisar por meio de citometria de fluxo a capacidade fagocítica dos neutrófilos incubados com as duas concentrações de C13 (1 e 20 µmol/L), DMSO (0,1% - controle solvente), FIPI (1 e 20 µmol/L) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina.

Por meio da análise da MIF foi possível observar que a C13, nas duas concentrações estudadas, não interfere na capacidade fagocítica que neutrófilos humanos tem de englobar IC precipitado formado de IgG-OVA, por meio da ligação dessas moléculas aos receptores para a porção cristalizável das imunoglobulinas (Fcγ) (ver figura 4.6).

Quando o IC precipitado foi opsonizado com soro humano normal (IgG-OVA/SNH), a C13, na maior concentração testada, mostrou uma tendência em inibir esse processo (figura 4.7), mas os dados não são estatisticamente diferentes. Na concentração de 1 µmol/L, CI₅₀ da QL, esse efeito não foi observado. Para fagocitar esses IC os neutrófilos realizam a cooperação entre os FCγRIIa, FCγRIIb e também o CR3 (CD11b/CD18 ou Mac1).

Figura 4.6. Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA - (OVA marcada com FITC). Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (5% de CO_2 , 30 min, 37°C) com C13 (1 e $20 \mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle negativo), citocalasina D ($10 \mu\text{mol/L}$ - controle positivo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC: IgG-OVA ($60 \mu\text{g/ml}$) (OVA marcada com FITC), e realizada incubação (5% de CO_2 , 30 min, 37°C). **a)** Mediana da Intensidade de Fluorescência obtida através de citometria de fluxo; **b)** Valores de porcentagem de inibição da fagocitose calculados em relação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Figura 4.7. Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA/SHN - (OVA marcada com FITC). Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (5% de CO₂, 30 min, 37°C) com C13 (1 e 20 μ mol/L), DMSO (0,1% - controle negativo), citocalasina D (10 μ mol/L - controle positivo) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC: IgG-OVA/SHN (60 μ g/ml) (OVA marcada com FITC), e realizada incubação (5% de CO₂, 30 min, 37°C). **a)** Mediana da Intensidade de Fluorescência obtida através de citometria de fluxo; **b)** Valores de porcentagem de inibição da fagocitose calculados em relação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** SHN: soro humano normal.

Figura 4.8. Fagocitose de imunocomplexos precipitados formados de $F(ab')_2$ -OVA/SHN - (OVA marcada com FITC). Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (5% de CO_2 , 30 min, $37^\circ C$) com C13 (1 e 20 $\mu mol/L$), DMSO (0,1% - controle negativo), citocalasina D (10 $\mu mol/L$ - controle positivo), FIPI (1 e 20 $\mu mol/L$) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e em seguida estimulados com IC: $F(ab')_2$ -OVA/SHN (60 $\mu g/ml$) (OVA marcada com FITC), e realizada incubação (5% de CO_2 , 30 min, $37^\circ C$). **a)** Mediana da Intensidade de Fluorescência obtida através de citometria de fluxo; **b)** Valores de porcentagem de inibição da fagocitose calculados em relação ao controle negativo (DMSO 0,1%). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** SHN: soro humano normal.

O IC precipitado formado de F(ab')-OVA/SHN, liga-se exclusivamente ao receptor CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1) presente na membrana dos neutrófilos. Esse receptor liga-se preferencialmente ao componente C3bi do complemento, sendo importante para a imunidade inata já que ativa a fagocitose de neutrófilos sem a necessidade de anticorpos. No entanto a função desse receptor é mais conhecida pela cooperação que o mesmo tem com os receptores para a porção cristalizável das imunoglobulinas (FcγR), na ativação dos mecanismos efetores dos neutrófilos (Jongstra-Bilen, Harrison e Grinstein, 2003). Quando se utilizou IC precipitado, formado de F(ab')₂-OVA/SHN, a C13 na concentração de CI₅₀ da QL não interferiu no processo de fagocitose. No entanto, na concentração de 20 μmol/L, a C13 inibiu cerca de 60% o processo de fagocitose desses IC (ver figura 4.8).

Esses dados mostram que a C13 pode estar interferindo na sinalização celular desencadeada pelos CR3, já que a fagocitose de IC relacionada com esses receptores foi comprometida. Quando ativa-se o neutrófilo via CR3, a principal via de sinalização envolvida no desencadeamento das suas funções efectoras é a que envolve a enzima fosfolipase D (PLD) (Fallman, Andersson e Andersson, 1993). Essa via de sinalização é iniciada pela ativação do fosfatidinositol-3-fosfato (PI3K), culminando com a ativação da PLD que por sua vez promove o aumento na mobilização de cálcio intracelular, como também o influxo extracelular desse íon.

Uma vez que a atividade dessa enzima está diretamente relacionada com a ativação dos CR3, pretendia-se investigar se a C13 teria um papel semelhante ao do 5-fluoro-2-indolil desclorhalopemida (FIPI) inibidor padrão da PLD. O FIPI, na concentração de 20 μmol/L, inibiu cerca de 40% o processo de fagocitose de IC precipitados formados de F(ab')₂-OVA/SHN, enquanto que a C13, nessa mesma concentração inibiu cerca de 60% (ver figura 4.8). Assim sendo, a C13 foi mais eficiente em inibir o processo de fagocitose do que o inibidor padrão da PLD.

4.3.1. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na expressão dos receptores CD11b/CD18 (CR3 ou Mac1) na membrana celular de neutrófilos humanos:

Como a C13 inibiu o processo de fagocitose de IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN, foi avaliado se essa substância interfere na expressão do Receptor do tipo 3 para componentes do Complemento (CR3 ou CD11/CD18 ou Mac1), tendo em vista que esses são os receptores envolvidos na ingestão desse tipo de IC. Eles são expressos na membrana celular na forma inativa e ativa. Para serem expressos na forma ativa necessitam do desencadeamento de sinalização celular, evento esse que pode ser estimulado pelo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Diamond & Springer 1993).

Através de imunofenotipagem, foi possível analisar a expressão do CR3 na membrana celular de neutrófilos incubados com as duas concentrações de C13 (1 e 20 µmol/L), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. Conforme mostrado na figura 4.9, a C13 não interferiu na expressão da molécula CR3, tanto na forma total, como na forma ativa, sugerindo que o efeito inibitório que o derivado 3-fenilcumarínico exerceu na fagocitose via CR3 não está relacionada com a expressão desse receptor na membrana da célula.

Figura 4.9. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a expressão do receptor CD11b/CD18, na forma total e ativa, na membrana de neutrófilos humanos: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, foram estimulados ou não com PMA 10^{-7} mol/L por 5 minutos e analisados em Citômetro de fluxo quanto à expressão do CR3. **a)** Valores de Mediana de Intensidade de Fluorescência para a expressão do CR3 na forma total; **b)** Valores de Mediana de Intensidade de Fluorescência para a expressão do CR3 na forma ativa. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.4. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a desgranulação e a atividade da enzima elastase de neutrófilos humanos:

4.4.1. Atividade da elastase liberada de neutrófilos estimulados com fMLP após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico C13:

Os neutrófilos possuem diversas proteínas granulares com função microbicida. Após reconhecer e fagocitar os agentes infecciosos, essas células liberam o conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos no fagossoma, originando o fagolisossoma, compartimento responsável pela destruição dos patógenos fagocitados (Amulic, et al., 2012). A enzima elastase é uma proteína presente nos grânulos primários dos neutrófilos. Sua liberação é regulada pela produção de espécies reativas de oxigênio (Reeves, et al., 2002). Dessa forma, como a C13 inibiu o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados, foi realizado o ensaio de desgranulação da enzima elastase. Para isso, neutrófilos foram previamente incubados com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DPI nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1% ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina por 30 minutos. Posteriormente os neutrófilos foram estimulados para liberação do conteúdo dos grânulos primários ou azurófilos, nos quais se encontra a enzima elastase. Após estimulação com fMLP (10^{-7} mol/L), a atividade da enzima foi avaliada através da degradação do substrato SAAVNA. A Figura **4.10a** apresenta o perfil representativo da cinética de degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase. Os valores de absorvância no tempo de 30 minutos foram utilizados para o cálculo da inibição da atividade da enzima elastase liberada pelas células incubadas com as duas concentrações de C13 em relação ao DMSO (0,1% - controle solvente) (ver figura **4.10b**).

Os resultados apresentados mostram que a atividade da enzima elastase, liberada dos neutrófilos quando estimulados com fMLP, diminuiu quando as células foram previamente incubadas com a C13. Na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ a C13 inibe cerca de 40% a liberação da enzima elastase, já na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ inibe aproximadamente 10% (ver figura **4.10c**).

O DPI é uma droga bastante utilizada na literatura científica, pois é sabido que ela interfere na montagem do complexo enzimático da NADPH oxidase, sendo que na concentração máxima estudada, 20 $\mu\text{mol/L}$, é capaz de inibir cerca de 95% da produção de ERO (dados não apresentados). Esse composto, na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$, inibiu cerca de 30% do processo de desgranulação (ver figura **4.10c**).

Figura 4.10. Desgranulação de neutrófilos, estimulados com fMLP, por meio da análise da atividade da enzima elastase liberada. Neutrófilos foram incubados com C13 e DPI nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1% ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e estimulados com fMLP (10^{-7} mol/L). **a:** Perfil cinético representativo da atividade da enzima elastase liberada através da medida da variação da absorbância em 405 nm; **b:** Valores de absorbância após 30 minutos de incubação da enzima elastase, proveniente de neutrófilos incubados com os referidos tratamentos, com o substrato SAAVNA; **c:** Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase calculada em relação ao DMSO (0,1% - controle solvente). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos com medidas em duplicata. O espontâneo representa a liberação da elastase por células não estimuladas. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** **E:** Espontâneo; **DMSO:** dimetilsulfóxido, **fMLP:** N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, **SAAVNA:** N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

4.4.2. Atividade da elastase liberada de neutrófilos, estimulados com Imunocomplexo Imobilizado formado de IgG-OVA, após incubação com o derivado 3-fenilcumarínico C13:

Para este ensaio, os neutrófilos foram previamente incubados com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1%, DPI 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$ ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina por 30 minutos. Posteriormente as células foram estimuladas a fim de liberarem o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos, nos quais se encontra a enzima elastase. Para isso, as células com os referidos tratamentos, foram transferidas para placas de 96 poços que possuíam imunocomplexos imobilizados formados de IgG-OVA. A atividade da enzima elastase foi avaliada através da degradação do substrato SAAVNA. A Figura **4.11a** mostra os valores de absorvância no tempo de 30 minutos. Já a figura **4.11b** diz respeito à porcentagem da inibição da atividade da enzima elastase, calculada em relação ao tratamento com DMSO (0,1%).

Analizando-se os dados foi possível observar que a liberação da enzima elastase diminuiu quando as células foram previamente incubadas com a C13. Esse decréscimo foi significativo já que a concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ do derivado 3-fenilcumarínico inibiu cerca de 80% desse processo. Quando se empregou a concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, concentração próxima do CI_{50} da QL, essa inibição foi de aproximadamente 10%. Esses dados mostram que quando as células são estimuladas com IC imobilizado à placa, a eficiência da C13 em inibir a desgranulação é mais acentuada do que quando os neutrófilos são estimulados com fMLP, já que nesse último estímulo a C13 apresentou uma porcentagem de inibição da desgranulação de aproximadamente 40% (ver figura **4.11b**).

O DPI, na máxima concentração testada, inibiu cerca de 60% do processo de desgranulação quando as células foram estimuladas com IC imobilizado (ver figura **4.11**).

Figura 4.11. Desgranulação de neutrófilos, estimulados com IC, por meio da análise da atividade da enzima elastase liberada de neutrófilos. Neutrófilos foram incubados com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1%, DPI nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$ ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e estimulados com Imunocomplexos imobilizados à placa de 96 poços. **a)** Valores de absorbância obtidos após 30 minutos de incubação da enzima elastase, proveniente de neutrófilos incubados com os referidos tratamentos, com o substrato SAAVNA **b)** Inibição da atividade da enzima elastase liberada após 30 minutos de incubação com o substrato SAAVNA. Porcentagem de inibição da atividade da enzima elastase calculada em relação ao DMSO (0,1% - controle solvente). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos com medidas em duplicata. O espontâneo representa a liberação da elastase por células não estimuladas. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** **E:** Espontâneo; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **SAAVNA:** N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

4.4.3. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade da enzima elastase isolada:

Com a finalidade de verificar se os resultados obtidos no item anterior estavam relacionados com a inibição no processo de desgranulação ou se o derivado 3-fenilcumarínico possui uma ação direta sobre a atividade catalítica da enzima elastase, foi realizado o ensaio no qual se utilizou apenas o sobrenadante das células, rico em elastase, após a realização do processo de desgranulação. Neste ensaio foi avaliado o efeito da C13 sobre a capacidade da enzima elastase de reconhecer e degradar o substrato SAAVNA.

A Figura **4.12a** apresenta o perfil cinético representativo da degradação do substrato SAAVNA pela enzima elastase, previamente isolada e incubada com a C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1% ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, enquanto a Figura **4.12b** mostra o valor de absorbância para o tempo de 30 minutos de incubação com o substrato SAAVNA.

A C13 não inibiu a atividade catalítica da enzima elastase isolada previamente de neutrófilos, tendo em vista que não houve diferença significativa do tratamento com essa substância em relação ao controle solvente (DMSO 0,1%). Portanto, a C13 inibiu a desgranulação de neutrófilos, verificado nos itens anteriores e não a atividade dessa enzima (ver figuras 4.10 e 4.11).

Figura 4.12. Atividade da enzima elastase, isolada previamente, de neutrófilos humanos estimulados com fMLP. Neutrófilos foram estimulados com fMLP (10^{-7} mol/L) e o sobrenadante contendo a elastase foi incubado com C13 nas concentrações de 1 e 20 μ mol/L, DMSO 0,1% ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. **a:** Perfil cinético representativo da atividade da enzima elastase, previamente isolada de neutrófilos humanos, através da medida da variação da absorbância em 405 nm; **b:** Valores de absorbância após 30 minutos de incubação da enzima elastase, isolada previamente de neutrófilos, com o substrato SAAVNA. O espontâneo representa a liberação da elastase por células não estimuladas. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** **E:** Espontâneo; **DMSO:** dimetilsulfóxido, **fMLP:** N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, **SAAVNA:** N-succinil-Ala-Ala-Val-*p*-nitroanilida.

4.5. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a atividade microbica de neutrófilos humanos:

O uso de terapias que minimizam os efeitos deletérios da ativação excessiva dos neutrófilos pode levar à redução na capacidade do organismo de reconhecer e eliminar os agentes infecciosos (Lazaro & Morel, 2015). Assim sendo, após verificar que o derivado 3-fenilcumarínico foi capaz de inibir a QLLum e a QLluc e também a fagocitose via CR3 de neutrófilos humanos, foi realizado um ensaio visando avaliar se a C13 possuía alguma influência na capacidade dos neutrófilos em destruir os agentes infecciosos fagocitados.

Para isso, os neutrófilos foram incubados com a C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO 0,1% ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina e posteriormente foi adicionada uma suspensão de *Candida albicans* ao meio. Após o período de incubação, para a realização da fagocitose e destruição dos micro-organismos, a viabilidade da levedura foi avaliada através de ensaios de redução do MTT. Com os valores de Absorvância (545 nm) obtidos, foram calculadas as porcentagens de morte de *C. albicans* em relação ao controle positivo - DMSO 0,1% (100 % de viabilidade). Os resultados referentes a este ensaio estão demonstrados na Figura 4.13. De acordo com os resultados, a C13 não apresentou atividade fungicida nas duas concentrações testadas, pois não houve diferença significativa entre a C13 e o controle solvente (DMSO 0,1%), em relação à porcentagem de morte das leveduras, tampouco inibiu a capacidade do neutrófilo de matar o fungo.

Figura 4.13. Atividade Microbicida de 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 C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina, na presença e na ausência de neutrófilos humanos (1×10^6 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 os diferentes tratamentos. A porcentagem de morte da levedura foi calculada em relação ao controle positivo (100% de viabilidade). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos realizados em duplicata. **Análise estatística:** *amostras estatisticamente diferentes em relação aos controles HBSS e DMSO 0,1% ($p < 0,05$; ANOVA seguido de teste Dunnett's Multiple Comparison. **Abreviaturas:** CP: controle positivo.

4.6. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Mobilização e no Influxo de Cálcio de neutrófilos humanos estimulados:

A mobilização e o influxo de Ca^{2+} são eventos extremamente necessários para o desencadeamento das funções efetoras dos neutrófilos. O aumento de Ca^{2+} citosólico possibilita a polimerização do citoesqueleto de actina, evento importante para o processo de quimiotaxia, como também para a emissão dos pseudopodes e a efetivação da fagocitose. Além disso, sabe-se que o aumento desse íon no citosol da célula é importante para que o neutrófilo efetive as etapas de desgranulação de seus grânulos, como também ative o complexo da NADPH oxidase e consequente produção de ERO (Nunes e Demarex, 2010).

O derivado 3-fenilcumarínico modulou a produção de ERO, com CI_{50} de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/L}$, e na maior concentração testada (20 $\mu\text{mol/L}$), interferiu no processo de desgranulação celular, inibindo cerca de 80%, quando as células foram estimuladas com IC imobilizados. Além disso, a C13 inibiu a fagocitose de IC formados de $\text{F(ab')}_2\text{-OVA/SHN}$ em cerca de 60%. Todos esses eventos que foram modulados necessitam que ocorra o aumento do íon Ca^{2+} no citosol para que eles aconteçam. Dessa forma, foi avaliado se a C13 interfere na mobilização e influxo de cálcio de neutrófilos humanos estimulados com fMLP e IC formados de IgG-OVA/SHN. Para isso, os neutrófilos foram incubados com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente), verapamil (10 $\mu\text{mol/L}$ - controle positivo) ou HBSS suplementado com 2% de SBF.

Observando os dados, de variação da fluorescência e de variação da concentração de Ca^{2+} , foi possível concluir que o derivado 3-fenilcumarínico não interferiu nas etapas de mobilização e influxo de Ca^{2+} de neutrófilos humanos estimulados tanto com fMLP como também com IC, sugerindo que os efeitos modulatórios descritos anteriormente que essa substância está exercendo em funções efetoras de neutrófilos não estão relacionados com a interferência na mobilização e o influxo de cálcio (ver figuras 4.14 e 4.15).

Figura 4.14 Mobilização e Influxo de Ca^{2+} de neutrófilos humanos estimulados com fMLP: Neutrófilos (4×10^6 ml), marcados com a sonda FLUO- 3-AM, foram incubados com C13 (1 e 20 μ mol/L), DMSO (0,1% - controle negativo), verapamil (10 μ mol/L - controle positivo) ou HBSS suplementado com 2% de SBF e em seguida estimulados com fMLP 10^{-7} mol/L, e imediatamente mensurada a fluorescência em fluorímetro de placa. Cinéticas da variação da fluorescência, obtida por meio da diferença de fluorescência mensurada antes e após a adição do estímulo; e da variação da concentração de Ca^{2+} , obtida por meio da diferença de concentração de Ca^{2+} mensurado antes e após a adição do estímulo. Foram realizados no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. As células tratadas com HBSS não foram estimuladas.

Figura 4.15. Mobilização e Influxo de Ca²⁺ de neutrófilos humanos estimulados com IC: Neutrófilos (4×10^6 ml), marcados com a sonda FLUO- 3-AM, foram incubados com C13 (1 e 20 μ mol/L), DMSO (0,1% - controle negativo), verapamil (10 μ mol/L - controle positivo) ou HBSS suplementado com 2% de SBF e em seguida estimulados com IC: IgG-OVA/SHN (120 μ g/ml), e imediatamente mensurada a fluorescência em fluorímetro de placa. Cinéticas da variação da fluorescência, obtida por meio da diferença de fluorescência mensurada antes e após a adição do estímulo; e da variação da concentração de Ca²⁺, obtida por meio da diferença de concentração de Ca²⁺ mensurado antes e após a adição do estímulo. Foram realizados no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. As células tratadas com HBSS não foram estimuladas. **Abreviaturas:** SHN: soro humano normal.

4.7. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Polimerização do Citoesqueleto de actina de neutrófilos humanos estimulados:

4.7.1. Análise qualitativa da Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos por meio de Microscopia Confocal:

A polimerização do citoesqueleto de actina dos neutrófilos é um evento chave para que essas células executem suas funções efectoras (Man, et. al., 2014). Junto com a mobilização e o influxo de cálcio, a polimerização do citoesqueleto está diretamente relacionada com os processos ativos dos fagócitos profissionais como: a quimiotaxia, a fagocitose de partículas e a desgranulação dos constituintes dos seus grânulos (. Até aqui, vimos que o derivado 3-fenilcumarínico, modula o “burst oxidativo”, a desgranulação de neutrófilos estimulados por IC e a fagocitose de IC formados de $F(ab')_2$ -OVA/SHN.

A dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina da célula é diretamente relacionada com os níveis redox da mesma (Bengtsson, et. al., 1991). Dessa forma, foi analisado o potencial do derivado 3-fenilcumarínico em interferir na polimerização do citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados com fMLP.

Observando as imagens obtidas na microscopia confocal (ver figura **4.16**), foi possível verificar que o fMLP é capaz de polimerizar o citoesqueleto de actina da célula, causando uma polarização dessa maquinaria celular, provavelmente à favor do estímulo. O tratamento das células com a C13 (20 $\mu\text{mol/L}$) acentuou essa polarização, assim como o DPI (50 $\mu\text{mol/L}$). Esses dados foram confirmados pela análise da intensidade de fluorescência das imagens por meio do software ImageJ, mostrando que o tratamento das células com a C13 aumenta a polarização do citoesqueleto de actina da célula (ver figura **4.17**). Dessa forma, a C13 interfere na dinâmica de polimerização do citoesqueleto da célula. Esse fato pode ser um dos possíveis mecanismos pelos quais essa substância está interferindo nos processos de quimiotaxia, fagocitose e desgranulação, já que essas funções efectoras estão diretamente relacionadas com a polimerização do citoesqueleto.

Figura 4.16. Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados: Neutrófilos (1×10^6 ml) incubados com C13 ($20 \mu\text{mol/L}$), DPI ($50 \mu\text{mol/L}$), Citocalasina B ($10 \mu\text{mol/L}$) ou DMSO ($0,1\%$ - controle negativo) foram estimulados com fMLP 10^{-6} mol/L por 1 minuto. A marcação do citoesqueleto foi feita com Faloidina acoplada ao fluorocromo rodamina (vermelho). O núcleo da célula foi marcado com DAPI. As imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal na objetiva de 63, com aumento de 3X. As imagens são representativas de três experimentos, com medidas em duplicata.

Figura 4.17. Quantificação da Polimerização do Citoesqueleto de neutrófilos humanos estimulados: Neutrófilos (1×10^6 ml) incubados com C13 (20 $\mu\text{mol/L}$), DPI (50 $\mu\text{mol/L}$), Citocalasina B (10 $\mu\text{mol/L}$) ou DMSO (0,1% - controle negativo) foram estimulados com fMLP 10^{-6} mol/L por 1 minuto. A marcação do citoesqueleto foi feita com Faloidina acoplada ao fluorocromo rodamina (vermelho). O núcleo da célula foi marcado com DAPI. As imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal na objetiva de 63, com aumento de 3X e a fluorescência foi quantificada utilizando-se o ImageJ.

4.8. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na Formação e Liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs):

4.8.1. Análise qualitativa da formação e liberação de NETs de neutrófilos humanos por meio de Microscopia Confocal:

Pesquisas mais recentes mostraram que neutrófilos em contato com alguns patógenos são capazes de liberar um emaranhado de fibras extracelulares constituídas de material genético associado às proteínas dos grânulos citoplasmáticos e histonas. Dentre outras atividades, as NETs, como são conhecidas essas redes extracelulares de DNA, servem para impedir a disseminação do agente infeccioso na corrente sanguínea, mas também têm um papel importante na patologia de algumas doenças.

A formação das NETs, dependendo do estímulo que as produzem, é um evento que está diretamente relacionado com as ERO. Isso tem sido descrito especialmente para o estímulo PMA. Além disso, para que as NETs sejam formadas é importante que a enzima elastase seja deslocada dos grânulos primários dos neutrófilos, até o núcleo da célula. Dessa forma, como o derivado 3-fenilcumarínico modula a produção de ERO e além do mais inibe a desgranulação, foram realizados experimentos para verificar se a C13 seria um potencial modulador da formação e liberação das NETs. As células foram incubadas com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DPI na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ ou DMSO (0,1% - controle solvente).

As imagens da figura **4.18**, mostram que o PMA foi capaz de estimular a formação e liberação das NETs. Pode-se observar que as células tratadas com DMSO 0,1%, apresentaram uma rede de material genético extracelular, marcadas em azul pelo DAPI, e associadas a essa rede está, com marcação em vermelho, a enzima elastase, demonstrando que de fato essa rede extracelular são as NETs. Foi possível observar ainda, que o tratamento com o DPI reduziu drasticamente a formação e liberação dessas redes de material genético. Esses dados revelam que as condições experimentais para a avaliação da formação e liberação das NETs foram bem estabelecidas. Quando as células foram incubadas com a C13 na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, foi observado que o processo de formação e liberação das NETs não foi comprometido, sugerindo que nessa concentração o derivado 3-fenilcumarínico não exerce nenhuma influência sobre esse processo. Por sua vez, quando os neutrófilos foram tratados com a maior concentração de C13, 20 $\mu\text{mol/L}$, a formação e liberação das NETs foi totalmente abolida, o que mostra que a C13 tem um papel importante em modular a formação das NETs. Esses dados também confirmam a idéia de que o derivado 3-fenilcumarínico executa papel importante em inibir o processo de desgranulação dos neutrófilos.

Figura 4.18. Formação e liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos humanos (NETs): Neutrófilos ($0,2 \times 10^6$ ml) incubados com C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DPI (1 $\mu\text{mol/L}$) ou DMSO (0,1% - controle negativo) foram estimulados com PMA 10^{-7} mol/L por 4 horas em condições de cultura celular (37°C , 5% de CO_2). A marcação da elastase foi feita com anticorpo primário (IgG anti-elastase de neutrófilos humanos). Anticorpo secundário (anti-IgG) acoplado ao fluorocromo Alexa Fluor 647 (vermelho) foi utilizado para a visualização em microscopia confocal. O núcleo da célula foi marcado com DAPI. As imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal na objetiva de 63. Elas são representativas de três experimentos, com medidas em duplicata.

4.8.2. Análise quantitativa da formação e liberação de NETs de neutrófilos humanos:

A análise quantitativa, por meio do Kit Picogreen - Invitrogen confirmou os dados dos experimentos qualitativos. Observando a figura 4.19, foi possível verificar que os controles experimentais foram bem estabelecidos, possibilitando uma avaliação coerente de possíveis agentes com efeito modulador na formação e liberação das NETs.

A C13, na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, não interferiu no processo de liberação do DNA nuclear de neutrófilos estimulados com PMA. Por sua vez, quando as células foram tratadas com a concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ de C13, houve uma redução de 50% nesse processo, comparando esse tratamento com as células incubadas com DMSO 0,1% (controle solvente). Dessa forma, a C13 pode ser classificada como uma possível molécula com potencial para o desenvolvimento de fármacos com efeito inibitório da formação e liberação das NETs. É importante notar ainda que nem as duas concentrações da C13 nem a concentração do DPI, por si só, foram capazes de promover a liberação do DNA nuclear (figura 4.19).

Figura 4.19. Quantificação da liberação de DNA de neutrófilos humanos estimulados: Neutrófilos ($0,2 \times 10^6$ ml) incubados com C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DPI (1 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle negativo) ou HBSS suplementado com 2% de SBF, foram estimulados com PMA 10^{-7} mol/L por 4 horas em condições de cultura celular (37°C , 5% de CO_2). A quantificação do DNA liberado foi realizado por meio do Kit Picogreen - Invitrogen. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. As células tratadas com HBSS não foram estimuladas. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** E: espontâneo; DPI: difenileno-iodônio.

4.9. Investigação do potencial tóxico do derivado 3-fenilcumarínico C13 em neutrófilos humanos mantidos sob condições de cultura celular

4.9.1. Análise do índice de apoptose e necrose, utilizando anexina V e iodeto de propídio (PI) em citometria de fluxo:

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, foi mostrado que até a máxima concentração testada (20 $\mu\text{mol/L}$), a C13 não apresenta citotoxicidade para os neutrófilos quando mantidos em contato com a mesma por até 30 minutos (Kabeya, et. al., 2007; Andrade, et al., 2013). Pensando numa possível aplicação terapêutica dessa substância em processos inflamatórios onde há uma participação efetiva dos neutrófilos, foi avaliado a viabilidade dessas células frente ao derivado 3-fenilcumarínico por um período de tempo mais estendido. Para isso, foram padronizadas as condições de cultura celular. Os neutrófilos foram cultivados por 6 e 12 horas e analisou-se as porcentagens de células marcadas para Anexina, Iodeto de Propídio (PI) ou ambos, em citometria de fluxo. De modo geral, os resultados apresentados na figura 4.20 mostram que o derivado 3-fenilcumarínico, não interferiu nos processos de morte e sobrevivência celular nos períodos de manutenção dos neutrófilos nas condições de cultura selecionadas (5% CO_2 , 37 °C).

Figura 4.20: Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a viabilidade de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com DMSO (0,1% - controle solvente), C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$) foram mantidos em condições de cultura celular (5% de CO_2 , 37°C) por 6 e 12 horas. As células foram analisadas em citômetro de fluxo quanto à porcentagem de células marcadas viáveis (Anexina V⁻ e PI⁻), em apoptose (Anexina V⁺ e PI⁻), em apoptose tardia (Anexina V⁺ e PI⁺) e em necrose (Anexina V⁻ e PI⁺). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. Controle solvente (DMSO 0,1%). **Análise estatística:** * ($p < 0,05$ vs. 6h - diferenças nas porcentagens de células viáveis e em apoptose (ANOVA seguido do teste de Tukey). **Abreviaturas:** PI: Iodeto de Propídio.

4.9.2. Análise da porcentagem de Hipodiploidia, utilizando iodeto de propídio (PI) como marcador, em citometria de fluxo:

A fim de confirmar os dados de porcentagem de células em apoptose e necrose, dos neutrófilos mantidos em condições de cultura celular por 6 e 12 horas descritos anteriormente, foi realizada a análise da fragmentação do material genético dessas células, já que a fragmentação do DNA nuclear é uma das principais características da morte celular programada.

De acordo com a figura 4.21, foi possível observar que o tratamento das células com a C13, não causou fragmentação do material genético nas células. Para o tempo de 6 horas de manutenção das células em cultura, a porcentagem de hipodiploidia ficou em torno de 2% para todos os tratamentos, inclusive para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já para o tempo de 12 horas, essa porcentagem foi de cerca de 4% para todos os tratamentos, com exceção do H_2O_2 que ficou em torno de 30%.

Os dados confirmam os resultados obtidos no item anterior onde o derivado 3-fenilcumarínico não alterou a viabilidade celular de neutrófilos mantidos em condições de cultura por até 12 horas (figura 4.20).

Figura 4.21. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a alteração do conteúdo de DNA de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$); DMSO (0,1% - controle solvente), HBSS suplementado com 2% de SBF ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - 1%), foram mantidos em cultura (6 e 12 horas, 5% de CO_2 , 37 °C) e analisados em Citômetro de fluxo quanto à porcentagem de fragmentação do material genético por meio de marcação para células hipodiplóides. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$ ANOVA seguido do teste de Tukey).

4.9.3. Análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH):

Para corroborar com os dados obtidos em relação aos dados obtidos anteriormente, foi realizado o ensaio de atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH) liberada de neutrófilos, tendo como controle positivo a lise total da célula com o uso do Triton X-100 0,2%. Nesse ensaio, não houve diferença na atividade da LDH liberada de neutrófilos tratados com DMSO (0,1% - controle solvente) em relação às células mantidas em cultura com a C13 na máxima concentração testada (20 $\mu\text{mol/L}$) (figura 4.22).

Figura 4.22. Determinação da atividade da enzima LDH de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular na presença do derivado 3-fenilcumarínico C13: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram mantidos em cultura (0, 6 e 12 horas, 5% de CO_2 , 37 °C) na presença do DMSO (0,1% - controle solvente), C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$) e HBSS suplementado com 2% de soro bovino fetal. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. Triton X-100 0,2% (controle positivo); DMSO (controle solvente). **Análise estatística:** letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.9.4. Análise da expressão dos receptores de membrana celular CD62L e CD64 de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular, utilizando citometria de fluxo:

À medida que os neutrófilos envelhecem, reduz-se a expressão em sua membrana celular da molécula de adesão CD62L (Boer et al., 2010; Futosi et al., 2013). Além disso, quando essas células são ativadas, começam a expressar em sua membrana celular, a molécula de ativação celular CD64 (Moulding, et. al., 1999). Assim, foi analisada a expressão dessas moléculas na membrana celular de neutrófilos mantidos em condições de cultura pelos períodos de 0, 6 e 12 horas.

Não houve diferença entre os tratamentos, nem, contudo entre os tempos de manutenção dos neutrófilos em cultura (figura 4.23a e 4.23b respectivamente).

Figura 4.23. Efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 sobre a expressão dos receptores CD62L, e CD64 de neutrófilos humanos mantidos em condições de cultura celular: Neutrófilos (1×10^6 ml) tratados com C13 (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 2% de SBF, foram mantidos ou não em cultura (0, 6 e 12 horas, 5% de CO_2 , 37 °C) e analisados em citômetro de fluxo quanto à expressão dos receptores de membrana **(a)** CD62L e **(b)** CD64. Os dados de expressão do CD64 estão representados somente pelos tempos de 0 e 12 h. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.10. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 no recrutamento *in vitro* de neutrófilos humanos por meio de câmara de Boyden:

Os neutrófilos estão em grande número na corrente sanguínea dos seres humanos, compondo cerca de 70% dos leucócitos circulantes. Quando acontece algum processo infeccioso ou inflamatório há um imediato e numeroso recrutamento dessas células para o foco inflamatório, sendo as primeiras a chegarem ao local da inflamação (Kolaczowska e Kubes, 2013). Portanto, elas são importantes para iniciar uma resposta imunológica. Em algumas doenças, elas são recrutadas, liberam o conteúdo dos seus grânulos e produzem ERO intensificando a patogênese da mesma (Wright, et. al., 2014).

O processo de recrutamento dos neutrófilos até o foco inflamatório é um evento dependente da polimerização do citoesqueleto de actina da célula, como também do status redox da mesma (Sakai, et. al., 2012; Taylor, et. al., 2014). Dessa forma, como a C13 inibe a produção de ERO e interfere na dinâmica de polimerização do citoesqueleto de neutrófilos estimulados com fMLP, foram realizados experimentos *in vitro* utilizando a câmara de Boyden, no intuito de verificar se a C13 interfere na quimiotaxia de neutrófilos. As células foram incubadas com C13 nas concentrações de 1 e 20 $\mu\text{mol/L}$, DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina. O valor de 1 $\mu\text{mol/L}$ é referente a média do valor do

CI₅₀ da QL, já o valor de 20 µmol/L foi a maior concentração testada em todos os experimentos.

De acordo com a figura 4.24, o derivado 3-fenilcumarínico, na concentração de 1 µmol/L, não interferiu no processo de quimiotaxia dos neutrófilos quando foram empregados os agentes quimiotáticos n-Formil-metionil-leucil-fínilalanina (fMLP), a interleucina 8 (IL-8) e o leucotrieno B₄ (LTB₄). Por sua vez, esse processo foi comprometido quando as células foram incubadas com a C13 na concentração de 20 µmol/L e empregados os agentes quimiotáticos fMLP e LTB₄.

Figura 4.24: Recrutamento *in vitro* de neutr3filos humanos por meio de c3mara de Boyden: Neutr3filos (1×10^6 mL) foram incubados com C13 (1 e 20 μ mol/L), DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,2% de gelatina por 30 minutos (37°C, 5% de CO₂). Na sequencia as c3lulas foram expostas aos agentes quimiot3ticos **(a)** fMLP (10^{-6} M), **(b)** IL-8 (20 ng/mL) e **(c)** LTB₄ (10^{-6} M) ou HBSS (controle positivo) por 1h (37°C, 5% de CO₂) em C3mara de Boyden. Decorrido esse per3odo, as membranas foram removidas, fixadas e coradas e os neutr3filos que migraram pela membrana foram contados ao microsc3pio 3tico, em pelo menos cinco campos aleatoriamente selecionados. Cada amostra foi medida em triplicata. Os resultados est3o expressos como media e desvio padr3o de no m3nimo tr3s experimentos. **An3lise estat3stica:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** DMSO: dimetilsulf3xido.

4.10.1. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 na expressão dos receptores de recrutamento (BLT1 e FLRP1) de neutrófilos humanos:

Para corroborar com os dados anteriores, foram realizados experimentos analisando-se a expressão dos receptores de recrutamento celular envolvidos no processo quimiotático dos neutrófilos. Como a C13 inibiu a quimiotaxia de neutrófilos frente aos agentes quimiotáticos fMLP e LTB₄, os receptores analisados foram o BLT1 (receptor para o LTB₄) e o FLRP1 (receptor para o fMLP). As células foram incubadas com C13 nas concentração de 20 µmol/L, DMSO (0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,1% de gelatina.

Ambos os receptores não sofreram alteração, quanto ao nível de expressão na membrana da célula, quando as mesmas foram incubadas com o derivado 3-fenilcumarínico na concentração de 20 µmol/L. Isso foi observado tanto quando as células foram estimulas com PMA, como também na ausência desse estímulo (ver figura 4.25). Apesar de inibir a quimiotaxia, a C13 não interferiu no nível de expressão dos receptores de membrana diretamente relacionados com esse processo, sugerindo que o mecanismo de inibição da quimiotaxia pela C13 não está envolvido com a expressão dos receptores quimiotáticos avaliados.

Figura 4.25: Expressão dos receptores quimiotáticos BLT1 e FLRP1 de neutrófilos humanos: Neutrófilos (1×10^6 mL) incubados com C13 (20 $\mu\text{mol/L}$), DMSO 0,1% - controle solvente) ou HBSS suplementado com 0,2% de gelatina por 30 minutos (37°C, 5% de CO_2) foram estimuladas ou não com PMA (10^{-7}mol/L), por 30 minutos, e analisados em Citômetro de fluxo quanto à expressão dos receptores quimiotáticos BLT1 (a) e FLRP1 (b). Os resultados representam a Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) e estão expressos como media e desvio padrão de no mínimo três experimentos com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.11. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13 em Modelo Animal de Artrite induzida por zimosan:

4.11.1. Avaliação do processo inflamatório na articulação de ratos Wistar com artrite induzida por zimosan:

Nos experimentos *in vitro*, o derivado 3-fenilcumarínico apresentou atividade inibitória sobre algumas funções efectoras de neutrófilos humanos, a saber: modulou negativamente o metabolismo dessas células quando as mesmas foram estimuladas com diferentes tipos de IC, inibiu o processo de fagocitose de IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN, interferiu na desgranulação da enzima elastase de células estimuladas com fMLP e IC, inibiu a quimiotaxia de neutrófilos frente ao agentes quimiotáticos fMLP e LTB₄, interferiu no processo de formação e liberação das NETs e modulou a polimerização do citoesqueleto de neutrófilos estimulados com fMLP. Esses resultados reforçaram a idéia de realizar experimentos *in vivo*, a fim de verificar se a C13 seria capaz de modular o processo inflamatório agudo.

Para isso, ratos Wistar foram divididos em grupos de acordo com os seguintes tratamentos: Grupo 1 - animais tratados com preparações lipossomais contendo C13 na concentração de 1mg/Kg; Grupo 2 - animais tratados com preparações lipossomais contendo Quercetina na concentração de 1mg/Kg; Grupo 3 - animais tratados com preparações lipossomais contendo DMSO (controle solvente); Grupo 4 - animais tratados com Dexametasona (4mg/Kg) na forma livre; Grupo 5 - animais tratados com NaCl 0,9% na forma livre. Uma hora após o tratamento, foi realizada a indução da inflamação na sinóvia dos animais com 300 µg de zimosan. Seis horas depois, foram avaliados o diâmetro da articulação, o número de neutrófilos e células totais presentes no líquido sinovial, como também a quantidade das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Observando a figura **4.26**, pode-se verificar que tanto a C13, como a Quercetina e a Dexametasona reduziram a variação no diâmetro da articulação, se comparados com os grupos controles (animais tratados com Salina e DMSO). Esse mesmo padrão de resposta também foi encontrado quando se avaliou o número de leucócitos totais que migraram para a sinóvia inflamada, mostrando que ambos os tratamentos foram eficientes em reduzir o processo inflamatório agudo induzido por zimosan na articulação dos animais (ver figura **4.27a**).

No que diz respeito ao número de neutrófilos que migraram para a articulação inflamada, foi possível constatar que o tratamento com a Dexametasona foi mais eficiente em reduzir esse

parâmetro. Contudo, a C13, assim com a Quercetina, também reduziram significativamente o número de neutrófilos que migraram para a sinóvia (figura 4.27b).

Figura 4.26: Variação no diâmetro das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos: Ratos wistar receberam injeção intra-articular de 300 µg de zimosan após 1 hora de tratamento com preparações lipossomais de C13 (1mg/Kg), Quercetina (1mg/Kg) ou DMSO (controle solvente); e na forma livre, Dexametasona (4mg/Kg) ou NaCl 0,9% (Salina). Antes e 6 horas após a indução da inflamação, foi medido o diâmetro da articulação através do uso de um paquímetro digital e a partir desses dados calculado a variação do diâmetro da articulação. Cada ponto no gráfico representa a variação da medida de uma articulação. **Análise estatística:** * ($p < 0,05$ ANOVA seguido de Tukey). **Abreviaturas:** DEXA: dexametasona; DMSO: dimetilsulfóxido; QUER: quercetina; **LUV:** lipossoma.

Figura 4.27: Migração de leucócitos totais e neutrófilos no líquido sinovial das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos: Ratos wistar receberam injeção intra-articular de 300 µg de zimosan após 1 hora de tratamento com preparações lipossomais de C13 (1mg/Kg), Quercetina (1mg/Kg) ou DMSO (controle solvente); e na forma livre, Dexametasona (4mg/Kg) ou NaCl 0,9% (Salina). Seis horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados e o líquido sinovial coletado para análise do número de leucócitos totais (a) e neutrófilos que migraram para a articulação inflamada, por meio de câmara de Neubauer. Cada ponto no gráfico representa a quantidade de células de uma articulação. **Análise estatística:** * ($p < 0,05$ ANOVA seguido de Tukey). **Abreviaturas:** DEXA: dexametasona; DMSO: dimetilsulfóxido; QUER: quercetina; **LUV:** lipossoma.

Com relação aos níveis das citocinas inflamatórias presentes no líquido sinovial, foi possível verificar que os compostos fenólicos C13 e Quercetina não reduziram os níveis de TNF-alfa, IL-1beta e IL-6, enquanto que o tratamento com a Dexametasona foi capaz de reduzir os níveis das três citocinas analisadas (figura 4.28).

Figura 4.28: Concentração das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no líquido sinovial das articulações dos animais submetidos aos diferentes tratamentos: Ratos wistar receberam injeção intra-articular de 300 μ g de zimosan após 1 hora de tratamento com preparações lipossomais de C13 (1mg/Kg), Quercetina (1mg/Kg) ou DMSO (controle solvente); e na forma livre, Dexametasona (4mg/Kg) ou NaCl 0,9% (Salina). Seis horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados e o líquido sinovial coletado para análise da concentração de TNF-alfa (a), IL-1beta (b) e IL-6 (c) por meio de kit de ELISA. Cada ponto no gráfico representa a concentração de citocinas de uma articulação. **Análise estatística:** * ($p < 0,05$ ANOVA seguido de Tukey). **Abreviaturas:** DEXA: dexametasona; DMSO: dimetilsulfóxido; QUER: quercetina; LUV: lipossoma.

V. DISCUSSÃO

Os neutrófilos são células da imunidade inata que representam cerca de 70% dos leucócitos circulantes em humanos, sendo importantes tanto para o início de uma resposta inflamatória, como também para a resolução da mesma (Bratton e Henson, 2011). Essas células possuem um arcabouço de mecanismos úteis na eliminação de um agente infeccioso, como a fagocitose de partículas e micro-organismos, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), liberação do conteúdo microbicida dos seus grânulos citoplasmáticos, liberação de redes extracelulares (NETs) e produção de mediadores capazes de modular a resposta imune de outras células (Nauseef, 2007; Strydom e Rankin, 2013; Kruger *et al.*, 2015; Leliefeld *et al.*, 2016).

Diversas pesquisas têm procurado entender a importância dessas células para a resolução do processo inflamatório, como também descobrir novos alvos e estratégias terapêuticas capazes de minimizar os efeitos indesejáveis do recrutamento excessivo das mesmas para o foco da inflamação (Poon *et al.*, 2014). Dentre essas pesquisas têm merecido destaque a busca por produtos de origem natural que possam oferecer o alicerce para o desenvolvimento de novos compostos capazes de interferir nas funções efectoras dos neutrófilos. Nesse contexto, compostos fenólicos, têm se mostrado promissores por serem bons moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados, dentre outras funções (Middleton e Kandaswami, 1992; Houlst e Paya, 1996; Fylaktakidou *et al.*, 2004; Ciz *et al.*, 2012).

Desde a década de 1990, nosso grupo de pesquisa vem investigando os efeitos de flavonóides e cumarinas no metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com imunocomplexos. (Kabeya *et al.*, 2008a) avaliaram o efeito de um grupo de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados via FcγR, onde algumas dessas substâncias inibiram de modo seletivo, diferentes etapas do processo em questão. A partir dos resultados obtidos, foram realizadas análises de relação quantitativa estrutura-atividade bidimensional e tridimensional (QSAR-2D e QSAR-3D, respectivamente), que direcionaram a seleção de algumas substâncias, consideradas promissoras como moduladores do metabolismo oxidativo de neutrófilos.

Em nosso trabalho de mestrado (Andrade *et al.*, 2013), foi observado efeito semelhante dos derivados 3-fenilcumarínicos em neutrófilos humanos estimulados via FcγR. Verificou-se que duas dessas fenilcumarinas possuíam atividade inibitória sobre a enzima mieloperoxidase, como também exerciam atividade “scavenger” de intermediários de oxigênio. Dessas, a 6,7-diidroxí-3-[3',4'-metilenodioxifenil]-cumarina (C13) possui duas características interessantes na sua estrutura molecular: a presença dos grupo substituinte orto-diidroxí nas posições 6 e 7 do esqueleto cumarínico e uma metilenodioxila ligada ao anel fenílico. A primeira estrutura

está relacionada com a atividade “scavenger” de ERO que essa substância possui, como também com a possível atividade inibidora da enzima mieloperoxidase. Já a segunda estrutura aumenta a capacidade dessa substância de interagir com membranas biológicas, servindo como um carreador da mesma para o espaço intracelular, sugerindo que a C13 possua alvos intracelulares de atuação (Van Acker, et. al., 1998; Vuotto, et. al., 2003).

Dessa forma, nesse trabalho avaliou-se o efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, selecionado com base em estudos anteriores, no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos desencadeado pela ativação dos receptores Fc γ , como também receptores CR, e a cooperação entre ambos. As demais funções dos neutrófilos, como quimiotaxia, fagocitose, desgranulação, atividade microbica, e formação e liberação das redes de DNA (NETs) também foram avaliadas, afim de verificar se essa substância interfere nas demais funções efectoras dos neutrófilos. Além disso, a C13 foi encapsulada em lipossomas e seu efeito testado em modelo animal de inflamação articular induzida por zimosan.

Já era sabido que a C13 apresentava um efeito modulador no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelhos e humanos estimulados via Fc γ R (Kabeya *et al.*, 2008b; Andrade *et al.*, 2013). No presente estudo ampliou-se essa investigação avaliando-se o efeito antioxidante da C13 no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via Fc γ R, CR ou ambos, como também por meio do estímulo solúvel (PMA). De acordo com os valores de CI₅₀, foi possível observar que o derivado 3-fenilcumarínico independente do receptor que é ativado na célula, inibe o metabolismo oxidativo de neutrófilos. Com cerca de 2 a 3 μ mol/L de C13 é possível inibir 50% do metabolismo celular, sendo que esta foi mais eficiente em inibir quando o metabolismo foi avaliado por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) (ver tabela 4.1).

A atividade antioxidante da C13 estar relacionada com os fatores presentes na estrutura dessa substância. A presença do grupo hidroxí é uma das características mais importantes para que uma substância desempenhe atividade antioxidante, tendo em vista que os grupos hidroxí podem atuar como sequestradores de radicais superóxido e HOCl (Bors *et al.*, 1990) citado por (Sarkar, Middy e Jana, 2012).

Experimentos *in vitro* utilizando a enzima MPO humana isolada mostraram que a C13 é capaz de inibir a atividade dessa enzima (Andrade, et. al., 2013). No entanto, nesses experimentos é impossível distinguir se esse efeito é decorrente da inibição direta da enzima ou da atividade “scavenger” de H₂O₂ e HOCl, que a C13 possui (Kabeya, et. al., 2008; Andrade, et. al., 2013). Através de cálculos utilizando *docking* foi possível observar que a

mesma interage com os resíduos Gln-91, His-95 e Arg-239 do sítio ativo da MPO. Os compostos HX1 e ABAH, inibidores padrão dessa enzima, também interagem com esses resíduos, impedindo o funcionamento da mesma (ver figura 4.5) (Forbes, et. al., 2013). Esses resíduos são importantes para que a MPO catalise o H_2O_2 , como também são responsáveis pela estabilização do seu sítio ativo (Poulos, et. al., 1980; Soubhye, et. al., 2010). Apesar das limitações desse último estudo e da necessidade de estudos adicionais serem realizados, é possível deduzir que a C13 tenha um efeito direto na MPO. Assim, o efeito inibitório da C13 na quimioluminescência é decorrente de dois fatores: sua atividade “scavenger” de H_2O_2 e HOCl e sua capacidade de inibir diretamente a atividade da MPO. Nos últimos anos, estudos de fármacos potencialmente capazes de inibir a MPO têm ganhado destaque, tendo em vista a importância dessa enzima para a patologia de inúmeras doenças (Malle, et. al., 2007; Lazarevic-Pasti, et. al., 2015).

A ativação de neutrófilos via receptores $\text{Fc}\gamma$ associados ou não a receptores para componentes do sistema complemento, leva à produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que são extremamente importantes para a eliminação dos patógenos. No entanto as ERO não atuam sozinhas nessa empreitada (Cassatella, Locati e Mantovani, 2009). Concomitante com a produção das ERO há a ativação de várias outras ferramentas que possibilitam o sucesso dos neutrófilos na defesa do organismo (Nauseef, 2007; Strydom e Rankin, 2013; Kruger *et al.*, 2015; Leliefeld *et al.*, 2016). Essas funções efetoras são: a fagocitose de partículas ou agentes infecciosos opsonizados por anticorpos ou componentes do sistema complemento; a desgranulação de proteínas como as enzimas elastase e catepsina G, com forte potencial microbicida; e a liberação das redes extracelulares de DNA (NETs) associado às histonas e proteínas dos grânulos citoplasmáticos, que sequestram os patógenos e impedem a sua disseminação pelo corpo. Tudo isso contribui para a eliminação do microorganismo da corrente sanguínea.

Até aqui, foi visto que o derivado 3-fenilcumarínico apresenta uma forte atividade antioxidante, apresentando CI_{50} de 1 $\mu\text{mol/L}$ para neutrófilos estimulados com IC formados de IgG-OVA. De maneira geral, as funções efetoras dos neutrófilos, para serem executadas, dependem direta ou indiretamente do nível redox da célula. Portanto a utilização de substâncias antioxidantes pode modular não só a produção das ERO, como também as demais funções dessas células, inclusive o processo de migração das mesmas até o foco inflamatório (Hattori *et al.*, 2010). Dessa forma, foram realizados experimentos para avaliar se a C13 seria capaz de interferir nas demais funções efetoras dessas células, no intuito de aprofundar os

estudos sobre os mecanismos de ação dessa substância, possibilitando que a mesma possa ser utilizada em um futuro próximo na terapia de doenças com participação ativa dos neutrófilos.

A fagocitose é uma das funções efetoras mais bem estudadas dos neutrófilos. É um processo ativo que além de requerer a mobilização e o influxo de cálcio, necessita principalmente da polimerização do citoesqueleto de actina (Bengtsson *et al.*, 1993). Além disso, ocorre geralmente quando a célula reconhece a partícula ou o agente infeccioso a ser fagocitado, por meio de receptores presentes na membrana celular (Underhill e Goodridge, 2012). Os neutrófilos possuem vários receptores na membrana responsáveis por reconhecer e fagocitar os agentes infecciosos ou partículas opsonizadas. Os mais importantes são os receptores para a porção cristalizável das imunoglobulinas G (FcγR) e também os receptores tipo 3 para proteínas do sistema complemento (CR3) (Downey *et al.*, 1999; Van Kessel, Bestebroer e Van Strijp, 2014).

O efeito do derivado 3-fenilcumarínico sobre a fagocitose, assim como sobre as demais funções efetoras que foram avaliadas e serão discutidas adiante, foi realizado em duas concentrações: 1 e 20 μmol/L. A primeira diz respeito a concentração próxima da quantidade necessária para inibir 50% do metabolismo oxidativo quando as células foram estimuladas com imunocomplexos formados de IgG-OVA; e a segunda é a concentração máxima testada para todos os experimentos. A C13 não inibiu a fagocitose de IC precipitados formados de IgG-OVA, mas apresentou uma tendência em reduzir a fagocitose de IC de IgG-OVA/SHN, na maior concentração (ver figuras 4.6 e 4.7). Já quando foi analisado se a C13 inibia a fagocitose de IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN, foi visto que a mesma, na maior concentração inibiu esse processo pela metade (ver figura 4.8).

A fagocitose desencadeada pelos CR3 envolve a sinalização dependente da enzima fosfolipase D (PLD) (Serrander, Fallman e Stendahl, 1996). No intuito de entender os possíveis mecanismos de atuação do derivado 3-fenilcumarínico na fagocitose de IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN, foi analisado se o inibidor padrão da PLD, o composto FIPI, apresentaria o mesmo padrão de inibição exercido pela C13. Observando os dados foi possível verificar que na concentração de 20 μmol/L, o FIPI inibiu cerca de 40% da fagocitose dependente de CR3 (ver figura 4.8).

Não é possível afirmar por meio desse experimento, que a C13 tenha um papel inibitório sobre a atividade da enzima PLD e que esse seja o mecanismo pelo qual ela está inibindo a fagocitose desencadeada via CR3. No entanto, é possível inferir que a C13 tenha um papel modulador dessa enzima e esse efeito soma-se ao efeito antioxidante que ela exerce, até

porque a inibição das ERO comprometem o processo de fagocitose dos neutrófilos, tendo em vista que o balanço redox é importante para a polimerização do citoesqueleto de actina dessas células, evento essencial para a execução da fagocitose (Sakai *et al.*, 2012). É importante notar ainda que a inibição da fagocitose de IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN, não é um efeito decorrente da redução na expressão da molécula CR3, já que a C13 não interferiu na expressão dessa molécula na membrana da célula, tanto na conformação ativa como na forma inativada (ver figura 4.9).

Após fagocitar os agentes infecciosos ou partículas opsonizadas, os neutrófilos fundem os seus grânulos citoplasmáticos com o fagossoma, formando o fagolisossoma. Essas células possuem em seus grânulos diversas proteínas, desde receptores que atuarão no reconhecimento dos patógenos, passando por proteases que destruirão a matriz extracelular até proteínas com atividade microbicida. (Faurschou e Borregaard, 2003; Hager, Cowland e Borregaard, 2010). A elastase é uma dessas moléculas com forte atividade microbicida e ao mesmo tempo importante para o agravamento de diversas doenças, onde o neutrófilo tem participação (Momohara *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2014; Gregory *et al.*, 2015; Muley *et al.*, 2016). Quando verificado se a C13 interferiria na desgranulação de neutrófilos, estimulados com fMLP e IC imobilizado, viu-se que a concentração de 1 µmol/L não modulou esse processo. Contudo, na concentração de 20 µmol/L a C13 inibiu a desgranulação dos neutrófilos, tanto estimulados com fMLP como IC, sendo que a inibição com esse último estímulo foi cerca de 80%, o dobro do registrado para o fMLP (ver figuras 4.10 e 4.11).

Sabe-se que a enzima elastase, presente nos grânulos primários ou azurófilos, está associada fortemente a matriz de proteoglicana, contida nesses grânulos, de forma que a liberação e subsequente ativação dessa enzima é dependente do influxo de íons e da variação do pH fagolisossomal. Esses dois eventos estão associados à produção do ânion superóxido pelo complexo enzimático da NADPH oxidase, presente na membrana fagossomal, permitindo que ocorra um influxo dos íons H⁺ e K⁺ para o fagolisossoma (Reeves *et al.*, 2002). Dessa forma, como a C13 na concentração de 20 µmol/L desempenha atividade “scavenger”, pode ser que interfira no processo de desgranulação por sequestrar o ânion superóxido e consequentemente influenciar nas etapas necessárias para a liberação e a ativação da elastase.

Já foi verificado que a quercetina é capaz de inibir a desgranulação de neutrófilos (Blackburn, Heck e Wallace, 1987). Num estudo comparativo do efeito inibitório de quatro flavonóides sobre a liberação da elastase por neutrófilos estimulados com fMLP, mostrou que dentre as quatro substâncias testadas, a quercetina apresentou o maior efeito inibitório

(Kanashiro *et al.*, 2007). De acordo com os autores, o efeito da quercetina estaria relacionado com a presença do grupo catecol na estrutura da molécula. A C13 possui um grupo substituinte orto-diidroxil nas posições C-6 e C-7 do esqueleto cumarínico, assemelhando-se a estrutura da quercetina. Cumarinas simples também já foram descritas com atividade inibitória da desgranulação de neutrófilos estimulados com fMLP (Kabeya *et al.*, 2013).

Recentemente, foi observado que um grupo de derivados 3-fenilcumarínicos foi capaz de inibir a desgranulação de mastócitos (Santos *et al.*, 2013), sendo que a presença do grupo catecol, dentre outros substituintes na molécula do derivado 3-fenilcumarínico, foi importante para a inibição desse processo. O DPI (1 e 20 $\mu\text{mol/L}$), um potente inibidor do complexo enzimático da NADPH oxidase, e, portanto um bom agente antioxidante, também apresentou efeito inibitório sobre a desgranulação de neutrófilos estimulados tanto com fMLP, como com IC imobilizados (ver figuras 4.10 e 4.11). Esses dados reforçam a ideia de que o balanço redox é importante para que os neutrófilos possam liberar a enzima elastase dos seus grânulos primários.

Esses dados são interessantes, pois condiciona a C13 como uma substância com potencial aplicação no tratamento de doenças onde há deposição de complexos imunes e consequente fagocitose frustrada. Esse mecanismo é bem característico de doenças autoimunes como a Artrite Reumatóide, onde ocorre a destruição das articulações por neutrófilos, que tentam fagocitar os imunocomplexos aderidos à cartilagem (Edwards e Hallett, 1997). Vale salientar que a C13 não apresenta atividade inibitória sobre a enzima elastase (ver figura 4.12).

Até aqui, foi visto que a C13 inibe a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados com diferentes tipos de IC; inibe cerca de 50% da fagocitose de IC formados de $\text{F(ab')}_2\text{-OVA/SHN}$ por neutrófilos e modula a desgranulação dessas células quando as mesmas são estimuladas com fMLP e IC imobilizados. Todas essas funções são importantes no combate aos agentes infecciosos.

A fim de verificar se a C13, na concentração do CI_{50} (1 $\mu\text{mol/L}$) ou na máxima concentração testada (20 $\mu\text{mol/L}$), interferiria na atividade microbica de neutrófilos humanos, foi avaliada a capacidade dessas células de destruir o fungo *Candida Albicans*. Os resultados mostraram que a C13, por si só, não apresentou atividade fungicida e quando os neutrófilos foram incubados com as duas concentrações de C13, os mesmos não perderam a sua atividade microbica e, portanto foram capazes de eliminar o fungo (ver figura 4.13).

Pesquisas recentes têm mostrado que o bloqueio da atividade da enzima NADPH oxidase não impede que neutrófilos eliminem a *C. albicans*, já que cepas desse fungo não germinaram

quando incubadas *in vitro* com neutrófilos tratados com o DPI, mostrando que possivelmente há outros mecanismos, independentes da ativação da NADPH oxidase, capazes de controlar essa infecção (Brothers *et al.*, 2013). No entanto, sabe-se que a ativação do metabolismo oxidativo dos fagócitos é essencial no combate às infecções com *C. albicans*, pois pacientes com a doença granulomatosa crônica, se não tratados, sucumbem às infecções com esse microorganismo (Cohen *et al.*, 1981). Esse paradigma foi esclarecido com experimentos que mostraram que Zebra Fish infectados com *C. albicans* e tratados com o DPI apresentam deficiência na migração de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, mostrando que a atividade da NADPH oxidase é importante para que ocorra a migração dessas células até o foco inflamatório (Brothers *et al.*, 2013).

Outro estudo mostrou que neutrófilos humanos usam dois mecanismos distintos para eliminar o fungo *c. albicans*, sendo que o que direciona a escolha de um desses mecanismos é o fato do fungo está opsonizado ou não. Se a *c. albicans* estiver opsonizada, a ativação do neutrófilo é dependente do receptor para a porção cristalizável das imunoglobulinas G (FcγR) e a atividade da NADPH oxidase é essencial para a eliminação do fungo. Por outro lado, se a *c. albicans* não estiver opsonizada, a atividade microbicida do neutrófilo é independente da NADPH oxidase (Gazendam *et al.*, 2014). Esse último mecanismo pode explicar porque a C13, na concentração de 20 μmol/L, não interferiu na capacidade do neutrófilo de eliminar o fungo, mesmo resultando numa modulação negativa das ERO produzidas por essas células.

O fato de uma substância antioxidante como a C13 não inibir a capacidade microbicida de neutrófilos é um dado interessante, pois possibilita o uso da mesma em doenças onde os neutrófilos tem participação, sem comprometer a resposta imune do indivíduo. No entanto, é descrito na literatura que substâncias antioxidantes como os flavonóides, podem prejudicar a atividade microbicida de neutrófilos contra bactérias. A quercetina e a naringenina impedem que os neutrófilos eliminem a bactéria *Staphylococcus aureus* (Yukari Nishimura *et al.*, 2013). Nesse contexto, apesar da C13 não ter interferido na capacidade microbicida de neutrófilos sobre *C. albicans*, essa atividade celular ainda precisa ser investigada utilizando outros agentes infecciosos, sobretudo bactérias, já que essas apresentam uma reprodução rápida e são as maiores causas de infecções.

O cálcio é essencial para que os fagócitos realizem as suas funções efectoras (Oflaherty *et al.*, 1991; Nunes e Demarex, 2010). A fim de verificar se os efeitos inibitórios da C13 na produção de ERO, fagocitose e desgranulação vistos até aqui, teria relação com o influxo e a mobilização de cálcio (Ca²⁺), foram realizados experimentos com neutrófilos estimulados

com fMLP e IC formados de IgG-OVA/SHN. Apesar dos efeitos apresentados pela C13, ela não é capaz de interferir na mobilização e/ou no influxo de Ca^{2+} quando as células são estimuladas com fMLP ou IC (ver figuras 4.14 e 4.15). Na literatura existem poucos trabalhos mostrando o efeito de compostos fenólicos na mobilização e o influxo de cálcio. O flavonóide quercetina que é o mais investigado, não apresenta a capacidade de inibir esse processo. Apenas o seu principal metabólito, 3-O-glucurônido, apresentou esse efeito em neutrófilos humanos estimulados com LPS e fMLP (Suri *et al.*, 2008).

Lembrando que os eventos do neutrófilo que sofreram interferência da C13 têm em comum o fato de serem processos ativos e com forte dependência da polimerização do citoesqueleto de actina da célula, foi investigado se o derivado 3-fenilcumarínico seria capaz de influenciar a dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina de neutrófilos humanos estimulados com fMLP. De maneira geral, foi possível observar que a C13, na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$, interferiu na polarização do citoesqueleto de neutrófilos, intensificando esse processo. Isso também foi visto para as células tratadas com DPI (50 $\mu\text{mol/L}$) (ver figuras 4.16 e 4.17).

O processo de polimerização do citoesqueleto é dinâmico e corresponde simultaneamente com a execução das funções efetoras dos neutrófilos. Essa dinâmica do citoesqueleto sofre influência direta do balanço redox da célula. As ERO são responsáveis pela glutationilação de grupos tiol em resíduos de cisteína presentes nas proteínas do citoesqueleto de actina (Lassing, *et al.*, 2007). A oxidação desses resíduos de cisteína promove mudanças estruturais na mesma, influenciando a dinâmica de polimerização do citoesqueleto (Dalle-Donne, *et al.*, 2003). Experimentos mostraram que neutrófilos tratados com DPI, apresentam menor taxa de glutationilação do citoesqueleto de actina do que células não tratadas. Eles verificaram ainda, que pacientes com a doença granulomatosa crônica possuem neutrófilos com menos glutationilação de resíduos cisteína do que células de indivíduos saudáveis. Essas células têm mais polimerização do citoesqueleto de actina, assim como aquelas que são tratadas com o DPI (Sakai *et al.*, 2012).

A polimerização do citoesqueleto de actina da célula é realizado de duas maneiras distintas: a polimerização por alongamento ou Filopoidia, onde monômeros de actina são adicionados de forma linear à rede de actina formada; e a polimerização ramificada ou Lamelipoidia, na qual acontece a bifurcação do citoesqueleto. Em ambos os processos GTPases estão envolvidas, sendo que no primeiro a GTPase Rho e a proteína formina possibilitam que aconteça o alongamento do citoesqueleto. Por sua vez, as GTPases Rac e Cdc42 juntamente com a proteína Arp2/3 promovem a ramificação do citoesqueleto (Jaffe & Hall, 2005).

Quando a célula é estimulada via FcγR predomina a polimerização ramificada do citoesqueleto. Por sua vez, quando as mesmas são estimuladas via CR3 ocorre a polimerização por alongamento (Freeman & Grinstein, 2014). Essas informações podem fornecer suporte para o entendimento do mecanismo de ação da C13 no processo de fagocitose de IC, tendo em vista que ela interferiu somente na fagocitose desencadeada via CR3 (ver figura X). Pesquisas mostraram que durante o processo de adesão celular, a ativação de integrinas promove a produção de ERO que são essenciais para que a célula possa realizar a polimerização do seu citoesqueleto e interagir de forma adequada com a matriz extracelular (Fiaschi, et. al., 2006). A C13 por interferir no balanço redox dos neutrófilos, pode levar ao comprometimento da dinâmica do citoesqueleto de actina. Com esse processo comprometido, a célula tem dificuldades em executar algumas das suas funções efetoras habituais, como a fagocitose via CR3, mas não compromete a fagocitose via FcγR, tendo em vista que essas duas formas de fagocitose utilizam vias de sinalização distintas. Assim, esse efeito também pode estar correlacionado com o fato da C13 poder inibir etapas da sinalização celular desencadeada via CR3, já que o inibidor da PLD, enzima importante nessa via de sinalização também inibe o processo de fagocitose via CR3 (ver figura X). Além do mais, a concentração de C13 que foi capaz de modular a fagocitose via CR3 pode não ter sido suficiente para interferir na fagocitose via FcγR já que essa envolve um número maior de interações entre a membrana celular e o alvo a ser fagocitado e consequentemente esse processo fagocítico é diferente do anterior (Aderem, A. A e Underhill, D. M).

Em 2004, foi verificado pela primeira vez que neutrófilos humanos eram capazes de liberar uma estrutura formada de DNA associado à histonas e proteínas dos grânulos citoplasmáticos como a elastase, a mieloperoxidase e a catepsina G (Brinkmann *et al.*, 2004). A elastase atua nesse processo facilitando a degradação de histonas, possibilitando a liberação do DNA e favorecendo a descondensação do material genético (Papayannopoulos *et al.*, 2010). As ERO ainda não têm um papel claro nesse processo, mas elas são fundamental para a formação e liberação das NETs, principalmente se as células forem estimuladas com o PMA (Fuchs *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2010; Nishinaka *et al.*, 2011; Keshari *et al.*, 2013; Rohm *et al.*, 2014).

Dentro desse contexto, foi avaliado o efeito do derivado 3-fenilcumarínico na formação e liberação das NETs. Conforme a figura 4.18, foi possível observar, por meio de microscopia confocal, que as células incubadas com a C13 na concentração de 20 μmol/L, tiveram uma inibição expressiva na formação e liberação das NETs. Esses dados foram confirmados pela realização de experimentos quantitativos que mostraram que a C13 inibiu 50% a liberação das

NETs (ver figura 4.19). Quando as células foram tratadas com a concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ de C13, esse efeito não foi observado.

Na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ a C13 inibe 95% da quimioluminescência da célula (ver figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4). Substâncias antioxidantes que atuam como “scavenger” de ERO ou interferem no funcionamento da NADPH oxidase e da mieloperoxidase, dificultam a formação das NETs (Kirchner *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Vorobjeva e Pinegin, 2016). Apesar de ter sido observado que as ERO são importantes para a formação das NETs especula-se qual seria o real papel que elas exerceriam nesse processo. Contudo não pode ser descartado o fato de que as ERO facilitam a citrulinização de histonas (Kawakami *et al.*, 2015) e sua produção é importantíssima para que ocorra a liberação da elastase dos grânulos azurófilos (Reeves *et al.*, 2002). A C13 também inibiu o processo de desgranulação da enzima elastase de neutrófilos estimulados (ver figuras 4.10 e 4.11). Conforme mencionado anteriormente, a elastase é importante para que ocorra a formação das NETs. Assim sendo, o efeito inibitório do derivado 3-fenilcumarínico na formação das NETs, pode ser a somatória de dois eventos: a inibição da produção de ERO e a interferência no recrutamento da enzima elastase dos grânulos azurófilos para o envelope nuclear da célula.

É sabido que as NETs tem, dentre outros efeitos benéficos, o papel de impedir a disseminação de agentes infecciosos através da corrente sanguínea (Fuchs, Brill e Wagner, 2012) e limitar a inflamação. (Schauer *et al.*, 2014). Contudo as NETs reforçam a patologia de inúmeras doenças, como é o caso das doenças autoimunes, onde elas aumentam a possibilidade de surgimento de novos autoantígenos, dentre outros eventos, acentuando e tornando crônico o processo inflamatório (Sangaletti *et al.*, 2012; Khandpur *et al.*, 2013). Assim sendo, uma substância natural capaz de impedir essas etapas poderia ser utilizada como terapia adjuvante ao tratamento convencional dessas doenças crônicas.

De maneira geral, o derivado 3-fenilcumarínico se mostrou um excelente modulador das funções efectoras de neutrófilos humanos *in vitro*. Esses resultados possibilitam que essa substância possa servir de protótipo para o desenvolvimento de fármacos com emprego em processos inflamatórios, onde ocorre o recrutamento em massa de neutrófilos. Dessa forma, pensando-se na aplicação terapêutica dessa substância, foram realizados experimentos visando analisar se a C13 interfere na viabilidade celular de neutrófilos mantidos em condições de cultura. Tendo em vista que para avaliar a apoptose de neutrófilos faz-se necessário mantê-los em condições de cultura (5% de CO_2 , 37°C) por um período mínimo de

seis horas, a viabilidade dessas células foi verificada quando as mesmas foram mantidas em cultura por até 12 horas.

Comparando os dois períodos de tempo analisados, foi possível verificar que, para todos os tratamentos, houve um acréscimo na porcentagem de células em apoptose à medida que o tempo de cultura aumentou. O contrário aconteceu para a porcentagem de células viáveis. A C13 não alterou a viabilidade celular, mostrando que essa substância não interfere nos processos de morte e sobrevivência de neutrófilos mantidos em condições de cultura por até 12 horas nas condições analisadas (ver figura 4.20). Além disso, a C13 não possui efeito citotóxico, quando analisada a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante da cultura celular (ver figura 4.21). Dentre as alterações morfológicas sofridas por neutrófilos em apoptose ocorre a clivagem do material genético, tornando esse material hipodiplóide (Riccardi e Nicoletti, 2006). A permanência das células por 12 horas em condições de cultura apresentou um aumento na porcentagem de células hipodiplóides, o que confirma os dados obtidos no experimento anterior, mas a C13 não interferiu nesse processo (ver figura 4.22).

Desde o momento que os neutrófilos deixam a medula óssea até a sua retirada da circulação, essas células apresentam uma variação no nível de expressão de alguns receptores de membrana. Muitas vezes, os níveis de expressão desses receptores reflete o estágio de envelhecimento ou o nível de ativação da célula. O receptor CD62L, por exemplo, tem a sua expressão reduzida à medida que a célula fica madura ou quando as células são ativadas. Por sua vez, a expressão do receptor para a porção cristalizável das imunoglobulinas G, FcγRI (CD64), é induzida e aumentada à medida que a célula é ativada (Zhang et al., 2015).

A análise da expressão desses receptores possibilitou verificar que as condições de cultivo celular estavam adequadas. A expressão dos receptores CD62L e CD64 não sofreu alteração após 12 horas de cultivo celular, possibilitando afirmar que as células não foram ativadas (ver figura 4.23a e 4.23b, respectivamente). A C13 não alterou o padrão de expressão de nenhum dos receptores, se comparado com o controle solvente de cada tempo (ver figura 4.23).

Pensando ainda em uma possível aplicação terapêutica da C13, foram realizados experimentos para avaliar o efeito da mesma na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. O recrutamento dos neutrófilos até o foco inflamatório é um processo necessário e importante para iniciar uma resposta imunológica contra determinado agente infeccioso (Summers *et al.*, 2010). Eles são capazes de migrar a favor dos gradientes quimiotáticos de fMLP, IL-8 e LTB₄,

pois possuem abundância de receptores em suas membranas para essas moléculas (Randis *et al.*, 2008; Alves-Filho *et al.*, 2010). A C13, na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$, inibiu a migração de neutrófilos, através de câmara de Boyden, frente aos estímulos quimiotáticos fMLP e LTB₄. Já na concentração do CI₅₀, a C13 não interferiu na migração dessas células (ver figura 4.24).

A quimiotaxia de neutrófilos é um evento intrinsecamente relacionado com a polimerização do citoesqueleto da célula (Chung, Funamoto e Firtel, 2001; Affolter e Weijer, 2005; Petry, Weitnauer e Gorch, 2010). Por sua vez, a polimerização do citoesqueleto depende do balanço redox (Lavastre *et al.*, 2002; Bengtsson, Orselius e Wettero, 2006; Kuiper *et al.*, 2011; Sakai *et al.*, 2012). A C13 interferiu na dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina do neutrófilo, aumentando a polarização da célula (ver figura X). Substâncias com forte atividade “scavenger” interferem na quimiotaxia de neutrófilos frente ao agente quimiotático fMLP por impedir que as ERO atuem na oxidação da fosfatase lipídica (PTEN - Phosphatase and tensin homolog, da sigla em inglês). A ausência de oxidação dessa enzima diminui sua atividade, aumentando a quantidade de fosfatidilinositol 3-fosfato na célula. O excesso desse composto na célula, como também a sua total ausência, compromete a dinâmica de polimerização do citoesqueleto, pois o mesmo é responsável pela ativação de pequenas GTPases da família Rho, como as Rac e Cdc42, que promovem a formação dos polímeros de actina (Ridley, 2001; Tapon and Hall, 1997, Benard et al., 1999, Kuiper, et. al., 2011). Dessa forma, a inibição da quimiotaxia pela C13, na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$, pode ser efeito da inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e consequente influência no recrutamento dessas células até o gradiente quimiotático, já que essa substância não interferiu na expressão dos receptores de recrutamento celular analisados (ver figura 4.25).

Outro aspecto interessante da quimiotaxia dos neutrófilos é que um mesmo agente quimiotático é capaz de ativar, ao mesmo tempo, proteínas G diferentes. Se a proteína Gi é ativada, desencadeia-se o recrutamento de GTPases Rac e a formação dos pseudópodes na região frontal da célula. Se proteínas G12 e 13 são ativadas, há a ativação de GTPases Rho e da miosina que reduzem a sensibilidade das demais regiões da célula ao agente quimiotático (Xu, et. al., 2003). Esses sinais divergentes promovem a polarização do neutrófilo e existe uma regulação intrínseca entre eles. Na fagocitose via CR3 ocorre a ativação de GTPases Rho. A C13 inibiu cerca de 50% da fagocitose dependente de CR3 (ver figura X). Assim, o efeito da mesma na inibição da quimiotaxia pode ser decorrente da interferência nessa via de sinalização.

O flavonóide quercetina é capaz de inibir a quimiotaxia de neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo*. Pesquisas mostraram que o tratamento de animais com diferentes concentrações de quercetina foi capaz de reduzir a quantidade de neutrófilos que migraram para o peritônio de quando foi injetado as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, como também fMLP e LTB₄ (Souto *et al.*, 2011). Outros estudos mostraram que o extrato bruto das folhas da *Moringa oleifera*, e compostos fenólicos isolados do extrato, reduziram a migração e a produção de ERO de neutrófilos humanos (Vongsak *et al.*, 2013).

Tendo em vista que a C13 apresentou um excelente papel modulador das funções efetoras de neutrófilos humanos e nas condições de cultura avaliadas, não interferiu na viabilidade celular e pensando na utilização dessa substância no tratamento de doenças que envolvem a participação dos neutrófilos, resolveu-se incorporá-la em lipossomas, afim de aumentar a sua biodisponibilidade e a sua estabilidade (Kapoor *et al.*, 2014). Atualmente, existem diversos veículos carreadores de fármacos que, além de outros benefícios, atuam principalmente no aumento da eficiência de tais compostos e ao mesmo tempo reduzem os efeitos colaterais indesejáveis dos mesmos (Torchilin, 2005; Karn, Cho e Hwang, 2013). Lipossomas formados de fosfatidilcolina e colesterol foram utilizados para encapsular a C13. Os dados de caracterização físico-química e de manutenção da atividade antioxidante da C13, incorporada no lipossoma, estão descritos no Apêndice 1.

Na tentativa de verificar se a C13 seria capaz de apresentar atividade *in vivo*, foram realizados experimentos utilizando ratos Wistar submetidos à inflamação articular induzida por zimosan. Os parâmetros avaliados foram à formação de edema nas articulações, a quantidade de leucócitos totais e neutrófilos que migraram para o líquido sinovial, como também a quantidade das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Em relação à formação de edema nas articulações, o tratamento dos animais com a C13, incorporada em lipossomas, e administrada no peritônio dos animais, apresentou uma menor variação no diâmetro da articulação (ver figura 4.26). Corroborando com esses resultados, a quantidade de leucócitos totais e de neutrófilos presentes na sinóvia de animais tratados com a C13 também foi significativamente menor do que nos animais tratados com o solvente (DMSO) (ver figura 4.27), apesar do tratamento com a substância, nas condições empregadas, não reduzir nenhuma das citocinas inflamatórias avaliadas (ver figura 4.28). Dessa maneira, a C13 foi capaz de reduzir o processo inflamatório estabelecido no modelo animal por interferir no recrutamento de neutrófilos para a sinóvia inflamada. A quimiotaxia de neutrófilos para o local da inflamação é um evento importante na efetivação de uma resposta imune, contudo em

doenças como a Artrite Reumatóide a migração dessas células para a articulação acentua a lesão tecidual ocasionadas por essa doença. Dessa forma, a redução da infiltração dessas células caracteriza-se como um evento importante para melhorar o quadro clínico da AR.

Diversos estudos têm avaliado o efeito de compostos fenólicos, como flavonóides e substâncias semelhantes, em diferentes modelos animais de inflamação (Khanna *et al.*, 2007; Nanjundaiah, Astry e Moudgil, 2013; Paoliello-Paschoalato *et al.*, 2015). No geral, os resultados desses estudos têm em comum o fato da redução do processo inflamatório está correlacionado com uma redução na produção de mediadores inflamatórios e com um aumento das defesas antioxidantes (Mamani-Matsuda *et al.*, 2006; Natarajan, Madhan e Tiku, 2015).

Utilizando o modelo animal de Artrite induzida por zimosan, pesquisadores , mostraram que o tratamento com o extrato da *Curcuma longa*, reduziu o infiltrado de neutrófilos no tecido sinovial dos animais, melhorando os parâmetros inflamatórios da articulação (Nonose *et al.*, 2014). Outros estudos observaram que a polpa do Pequi, *Caryocar coriaceum Wittm*, também promove efeito semelhante neste modelo animal (Bezerra De Oliveira *et al.*, 2015).

O uso de lipossomas para incorporação de drogas convencionais e o tratamento de modelos animais de artrite e de pacientes com Artrite Reumatóide tem sido utilizado nos últimos anos (Van Den Hoven *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2014). No entanto, estudos mostrando a incorporação de produtos de origem natural em lipossomas e a aplicação desses em modelos animais de artrite são raros (Capini *et al.*, 2009).

De maneira geral, na literatura científica a grande maioria dos estudos utilizando produtos de origem natural ou sintéticos, que avaliam os efeitos anti-inflamatório e/ou antioxidante em modelos animais de inflamações aguda e crônica empregam concentrações elevadas dessas substâncias, para demonstrar algum efeito. Nesse trabalho, a incorporação do derivado 3-fenilcumarínico (C13) em lipossomas, possibilitou mostrar que uma baixa concentração (1,5 mg/Kg) fosse capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados, demonstrando a manutenção dos efeitos C13, nas funções dos neutrófilos analisadas, *in vivo*.

Assim, a utilização dessa substância que foi capaz de reduzir os efeitos indesejáveis do recrutamento e ativação dessas células, sem inibir de maneira significativa o seu papel fisiológico em defesa do organismo, pode ser uma alternativa terapêutica ou um complemento aos tratamentos convencionais já estabelecidos para estas doenças inflamatórias onde há participação ativa dos neutrófilos.

VI. CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram que o Derivado 3-fenilcumarínico (C13) é uma substância sintética que pode ser utilizada na modulação das funções efectoras dos neutrófilos humanos, pois:

- A C13 modulou o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores FcγR e/ou CD11b/CD18 (CR3) por diferentes tipos de imunocomplexos [IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN], como também estímulo solúvel (PMA). Esse efeito foi dependente da concentração, sendo o valor de CI₅₀^{QL} em torno de 2 μmol/L. Na máxima concentração avaliada (20 μmol/L) ocorreu uma inibição de 95% da quimioluminescência em todas as condições analisadas.
- O derivado 3-fenilcumarínico C13 foi capaz de interagir com o sítio ativo da enzima mieloperoxidase humana de forma semelhante aos inibidores padrão da enzima (HX1 e ABAH), através de análises de *docking*;
- O derivado 3-fenilcumarínico, em concentração próxima do CI₅₀^{QL}, não interferiu na capacidade do neutrófilo de reconhecer e fagocitar os IC formados de IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN. No entanto na concentração de 20 μmol/L, reduziu a capacidade dos neutrófilos de fagocitar IC formados de F(ab')₂-OVA/SHN. Esse processo foi reduzido em cerca de 50% e não está relacionado com a expressão do CR3 na membrana da célula;
- O processo de desgranulação da enzima elastase foi comprometido, quando empregou-se concentração próxima do CI₅₀^{QL}. Contudo, na concentração de 20 μmol/L, a C13 inibiu cerca de 40% da liberação da enzima elastase, quando a célula foi estimulada via receptor para fMLP. Por sua vez, quando a célula foi estimulada por IC imobilizado, esse efeito inibitório foi acentuado, ficando próximo de 80%;
- Em relação à atividade microbida, a C13 na concentração próxima do CI₅₀^{QL}, não inibiu a capacidade dos neutrófilos de eliminar o fungo *C. albicans*. Na concentração de 20 μmol/L, apesar de inibir cerca de 95% da quimioluminescência, não impediu que os neutrófilos eliminassem o fungo. Além disso, a C13 não apresentou atividade fungicida;
- A C13 não interferiu na mobilização e no influxo dos íons cálcio em neutrófilos humanos estimulados por fMLP e por IC formados de IgG-OVA/SHN;
- Em relação à polimerização do citoesqueleto, a C13 na concentração de 20 μmol/L, interferiu na dinâmica de polimerização da actina, o que provocou um aumento na polarização do citoesqueleto. Essa observação pode estar relacionada com a ação da substância em diminuir a fagocitose via CR3 e a desgranulação da elastase;

- A formação e liberação das NETs foi comprometida em cerca de 50% quando neutrófilos, estimulados com PMA, foram incubados com a concentração 20 $\mu\text{mol/L}$ de C13. O tratamento com concentração próxima do $\text{CI}_{50}^{\text{QL}}$, não comprometeu esse processo;
- A C13 não interferiu na viabilidade de neutrófilos humanos mantidos sob condições de cultura celular por um período de até 12 horas;
- Concentração próxima do $\text{CI}_{50}^{\text{QL}}$ não inibiu o recrutamento *in vitro* de neutrófilos humanos desencadeado pelos agentes quimiotáticos fMLP, IL-8 e LTB_4 , mas a concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ interferiu nesse processo, quando empregou-se o fMLP e o LTB_4 como agentes quimiotáticos. Esse efeito não está relacionado com a redução dos níveis de expressão dos receptores na membrana da célula para esses quimioatraentes e parece estar relacionado com a interferência na dinâmica do citoesqueleto de actina da célula;
- A C13 apresentou efeito anti-inflamatório *in vivo*, pois animais com inflamação articular induzida por zimosan, tratados com 1mg/Kg dessa substância, incorporada em sistema lipossomal, tiveram redução no edema articular e nos números de leucócitos totais e neutrófilos que migraram para a sinóvia inflamada. Já os níveis das citocinas $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β e IL-6 não foram alterados.

De modo geral, o que se observa é que a C13, dependendo da concentração, foi capaz de modular o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via $\text{Fc}\gamma\text{R}$ e/ou CR3.

Em concentrações elevadas reduziu a capacidade dessas células de fagocitar apenas os IC formados de $\text{F(ab')}_2\text{-OVA/SHN}$, como também interferiu na desgranulação da enzima elastase, quando as mesmas foram estimuladas com fMLP e IC. No entanto esse efeito inibitório não comprometeu a capacidade dos neutrófilos de reconhecer e eliminar o fungo *C. albicans*. A C13 não interferiu no metabolismo de Ca^{2+} e na máxima concentração analisada, influenciou na dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina da célula. Além disso, foi possível observar que o derivado 3-fenilcumarínico inibiu a formação e liberação das NETs.

Em animais submetidos à inflamação articular induzida com zimosan, a C13, incorporada em sistema lipossomal, foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios analisados.

Assim sendo, este composto pode servir de protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que poderão ser empregados no tratamento de doenças, onde há intensa participação de neutrófilos como na Artrite Reumatoide.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-623, 1999 1999. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080436600019 >.

ADKISON, A. M. et al. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 3, p. 363-371, Feb 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173710500011 >.

AFFOLTER, M.; WEIJER, C. J. Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. **Developmental Cell**, v. 9, n. 1, p. 19-34, Jul 2005. ISSN 1534-5807. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230659000003 >.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, p. 9, Feb 2013. ISSN 1556-276X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316359300001 >.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, Jan 2013. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315547400008 >.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 708-U113, Jun 2010. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278394200038 >.

AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, Vol 30, v. 30, p. 459-489, 2012 2012. ISSN 0732-0582.

ANDRADE, M. F. **Estudo da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por complexos imunes**. 2012. 88 (Master). Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

ANDRADE, M. F. et al. 3-Phenylcoumarin derivatives selectively modulate different steps of reactive oxygen species production by immune complex-stimulated human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 387-394, Feb 2013. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316769700027 >.

ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040-2044, Aug 2009. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269396100013 >.

AULAKH, G. K. et al. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. **Cell and Tissue Research**, v. 355, n. 2, p. 375-396, Feb 2014. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334172700013 >.

BARCELLOS-DE-SOUZA, P. et al. Leukotriene B-4 inhibits neutrophil apoptosis via NADPH oxidase activity: Redox control of NF-kappa B pathway and mitochondrial stability. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 10, p. 1990-1997, Oct 2012. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309494300034 >.

BATZRI, S.; KORIN, E. D. Interaction of phospholipids vesicles with cells- endocytosis and fusion as alternate mechanism for uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 621-34, 1975.

BELAAOUAJ, A. et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. **Nature Medicine**, v. 4, n. 5, p. 615-618, May 1998. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000073399900036 >.

BELOSTOCKI, K. et al. Fc gamma RIIa is a target for modulation by TNF alpha in human neutrophils. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 78-86, Oct 2005. ISSN 1521-6616. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231942600012 >.

BENARD, V.; BOHL, B. P.; BOKOCH, G. M. Characterization of Rac and Cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13198-13204, May 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080200400038 >.

BENGTTSSON, T. et al. ACTIN DYNAMICS IN HUMAN NEUTROPHILS DURING ADHESION AND PHAGOCYTOSIS IS CONTROLLED BY CHANGES IN INTRACELLULAR FREE CALCIUM. **European Journal of Cell Biology**, v. 62, n. 1, p. 49-58, Oct 1993. ISSN 0171-9335. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993ME85500005 >.

BENGTTSSON, T.; ORSELIUS, K.; WETTERO, J. Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. **Cell Biology International**, v. 30, n. 2, p. 154-163, Feb 2006. ISSN 1065-6995. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236087500009 >.

BEZERRA DE OLIVEIRA, F. F. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Caryocar coriaceum Wittm fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 452-463, Nov 4 2015. ISSN 0378-8741. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000365050900047 >.

BIANCHI, M. et al. Restoration of NET Formation by Gene Therapy in CGD controls Aspergillosis. **European Journal of Pediatrics**, v. 169, n. 3, p. 389-389, Mar 2010. ISSN 0340-6199. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274036700054 >.

BLACKBURN, W. D.; HECK, L. W.; WALLACE, R. W. THE BIOFLAVONOID QUERCETIN INHIBITS NEUTROPHIL DEGRANULATION, SUPEROXIDE PRODUCTION, AND THE PHOSPHORYLATION OF SPECIFIC NEUTROPHIL PROTEINS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 144, n. 3, p. 1229-1236, May 14 1987. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987H337800018 >.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, Nov 2010. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286082600006 >.

BOURNAZOS, S. et al. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, n. 2, p. 244-254, Aug 2009. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267744500010 >.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1017-1025, Nov 2014. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343640700007 >.

BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 8, p. 350-357, Aug 2011. ISSN 1471-4906. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294102200002 >.

BRECHARD, S.; TSCHIRHART, E. J. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 5, p. 1223-1237, Nov 1 2008. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260016300001 >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, Mar 2004. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000220000100047 >.

BROTHERS, K. M. et al. NADPH Oxidase-Driven Phagocyte Recruitment Controls *Candida albicans* Filamentous Growth and Prevents Mortality. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 10, Oct 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330383800016 >.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, Nov 1 2009. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000271988200002 >.

BRUHNS, P. et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3716-3725, Apr 16 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000265445900012 >.

BYLUND, J. et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase How, where, and what for? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1834-1845, Dec 2010. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285445000002 >.

CACHAT, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. **Clinical Science**, v. 128, n. 10, p. 635-648, May 2015. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000351619900002 >.

CAPINI, C. et al. Antigen-Specific Suppression of Inflammatory Arthritis Using Liposomes. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 6, p. 3556-3565, Mar 15 2009. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264084100026 >.

CASCAO, R. et al. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 5, 2010 2010. ISSN 1478-6354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284625900046 >.

CASCAO, R.; ROSARIO, H. S.; FONSECA, J. E. NEUTROPHILS: WARRIORS AND COMMANDERS IN IMMUNE MEDIATED INFLAMMATORY DISEASES. **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 34, n. 2B, p. 313-326, Apr-Jun 2009. ISSN 0303-464X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268789100003 >.

CASCAO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 8, p. 531-535, Jun 2010. ISSN 1568-9972. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279554600002 >.

CASSATELLA, M. A.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Never Underestimate the Power of a Neutrophil. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 698-700, Nov 20 2009. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272097900003 >.

CHUNG, C. Y.; FUNAMOTO, S.; FIRTEL, R. A. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 9, p. 557-566, Sep 2001. ISSN 0968-0004.

CIZ, M. et al. Flavonoids Inhibit the Respiratory Burst of Neutrophils in Mammals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2012 2012. ISSN 1942-0900. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303721900001 >.

CLARK, A. J.; PETTY, H. R. A cell permeant peptide containing the cytoplasmic tail sequence of Fc receptor type IIA reduces calcium signaling and phagolysosome formation in neutrophils. **Cellular Immunology**, v. 261, n. 2, p. 153-158, 2010. ISSN 0008-8749. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274706400011 >.

COHEN, M. S. et al. FUNGAL INFECTION IN CHRONIC GRANULOMATOUS-DISEASE - THE IMPORTANCE OF THE PHAGOCYTE IN DEFENSE AGAINST FUNGI. **American Journal of Medicine**, v. 71, n. 1, p. 59-66, 1981 1981. ISSN 0002-9343. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1981LY01000011 >.

COSTA, C.; GERMENA, G.; HIRSCH, E. Dissection of the Interplay between Class I PI3Ks and Rac Signaling in Phagocytic Functions. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 1826-1839, 2010. ISSN 1537-744X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000282000500005 >.

CROSS, A. et al. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 521-528, Sep 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243015700009 >.

_____. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 10, p. 2796-2806, Oct 2003. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186040300014 >.

DALLE-DONNE, I. et al. Reversible S-glutathionylation of Cys(374) regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 23-32, Jan 1 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180022200003 >.

_____. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883-898, Sep 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249190500003 >.

DE MARCHI, A. A. et al. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4823-4833, Sep 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223845300007 >.

DE OLIVEIRA-JUNIOR, E. B. et al. The Human NADPH Oxidase: Primary and Secondary Defects Impairing the Respiratory Burst Function and the Microbicidal Ability of Phagocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 5, p. 420-427, May 2011. ISSN 0300-9475. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288799200004 >.

DEMKOWICZ, S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Fluorinated 3-Phenylcoumarin-7-O-Sulfamate Derivatives as Steroid Sulfatase Inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 87, n. 2, p. 233-238, Feb 2016. ISSN 1747-0277. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000370485300008 >.

DIXIT, N. et al. Migrational Guidance of Neutrophils Is Mechanotransduced via High-Affinity LFA-1 and Calcium Flux. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 472-481, Jul 1 2011. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000291799300054 >.

DOWNEY, G. P. et al. Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with Fc gamma RIIA receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28436-28444, Oct 1 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000082912700054 >.

DRABIKOVA, K. et al. Study of Possible Mechanisms Involved in the Inhibitory Effects of Coumarin Derivatives on Neutrophil Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013. ISSN 1942-0900; 1942-0994. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000327636900001 >.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, Jan 2010. ISSN 1001-0602. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273790500006 >.

EDWARDS, S. H. R. Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 15-21, Oct 2011. ISSN 1090-0233. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296263000007 >.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: The forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunology Today**, v. 18, n. 7, p. 320-324, Jul 1997. ISSN 0167-5699. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XK56200005 >.

EL KEBIR, D. et al. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**, v. 103, n. 4, p. 352-359, Aug 15 2008. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258441500008 >.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; PERIANIN, A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 778-785, Sep 2010. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280692800002 >.

ELOY, J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 123, p. 345-363, Nov 1 2014. ISSN 0927-7765. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000347580500045 >.

FALLMAN, M.; ANDERSSON, R.; ANDERSSON, T. SIGNALING PROPERTIES OF CR3 (CD11B/CD18) AND CR-1 (CD35) IN RELATION TO PHAGOCYTOSIS OF COMPLEMENT-OPSONIZED PARTICLES. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 1, p. 330-338, Jul 1 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993LM57900034 >.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, Nov 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186851900005 >.

FERINO, G. et al. MAO Inhibitory Activity of 2-Arylbenzofurans versus 3-Arylcoumarins: Synthesis, invitro Study, and Docking Calculations. **Chemmedchem**, v. 8, n. 6, p. 956-966, Jun 2013. ISSN 1860-7179. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319416800012 >.

FIASCHI, T. et al. Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22983-22991, Aug 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239542600060 >.

FILIPPIN, L. I. et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 415-422, Jun 2008. ISSN 0009-9104. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255643800004 >.

FORBES, L. V. et al. Potent Reversible Inhibition of Myeloperoxidase by Aromatic Hydroxamates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36636-36647, Dec 2013. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000328883400043 >.

FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 193-215, Nov 2014. ISSN 0105-2896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000343997600014 >.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231-241, Jan 2007. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243665800012 >.

FUCHS, T. A.; BRILL, A.; WAGNER, D. D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis Tobias. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 32, n. 8, p. 1777-1783, Aug 2012. ISSN 1079-5642. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000306558100014 >.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MOCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1185-1197, Dec 2013. ISSN 1567-5769; 1878-1705. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329378800026 >.

FYLAKTAKIDOU, K. C. et al. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3813-3833, 2004 2004. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224542300011 >.

GARDI, C. et al. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150-157, Oct 1 2015. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361644400017 >.

GAZENDAM, R. P. et al. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. **Blood**, v. 124, n. 4, p. 590-597, Jul 24 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342619600022 >.

GHARIB, R. et al. Liposomes incorporating cyclodextrin-drug inclusion complexes: Current state of knowledge. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 175-186, Sep 20 2015. ISSN 0144-8617. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000356746000023 >.

GORDY, C. et al. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 618-629, Jan 13 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286178700032 >.

GREGORY, A. D. et al. Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 2, p. 143-152, Aug 2015. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000357953700003 >.

HAGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 1, p. 25-34, Jul 2010. ISSN 0954-6820. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278620400004 >.

HAHN, I. et al. Cathepsin G and Neutrophil Elastase Play Critical and Nonredundant Roles in Lung-Protective Immunity against *Streptococcus pneumoniae* in Mice. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 12, p. 4893-4901, Dec 2011. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296920800014 >.

HATTORI, H. et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3546-3551, Feb 23 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275130900050 >.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149-160, May 2015. ISSN 1044-5323. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358822000002 >.

HEINZ, A. et al. The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 192-202, Jan 2012. ISSN 0300-9084. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300473200022 >.

HENSON, P. M. IMMUNOLOGIC RELEASE OF CONSTITUENTS FROM NEUTROPHIL LEUKOCYTES .1. ROLE OF ANTIBODY AND COMPLEMENT ON NONPHAGOCYTOSABLE SURFACES OR PHAGOCYTOSABLE PARTICLES. **Journal of Immunology**, v. 107, n. 6, p. 1535-&, 1971 1971. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1971L121400005 >.

HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, Jun 1996. ISSN 0306-3623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UU74000027 >.

HU, Y.; PHAM, C. T. N. Dipeptidyl peptidase I regulates the development of collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 8, p. 2553-2558, Aug 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231078800044 >.

HUANG, Z. Y. et al. Interaction of Two Phagocytic Host Defense Systems Fc gamma RECEPTORS AND COMPLEMENT RECEPTOR 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 160-168, Jan 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285782800017 >.

JACONI, M. E. E. et al. CYTOSOLIC FREE CALCIUM ELEVATION MEDIATES THE PHAGOSOME-LYSOSOME FUSION DURING PHAGOCYTOSIS IN HUMAN NEUTROPHILS. **Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 5, p. 1555-1564, May 1990. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DC93000009 >.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. In: (Ed.). **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.21, 2005. p.247-269. (Annual Review of Cell and Developmental Biology). ISBN 978-0-8243-3121-4.

JAKUS, Z. et al. Critical but overlapping role of Fc gamma RIII and Fc gamma RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 1, p. 618-629, Jan 1 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252162700070 >.

JONGSTRA-BILEN, J.; HARRISON, R.; GRINSTEIN, S. Fc gamma-receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45720-45729, Nov 14 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186452300082 >.

JOVANOVIC, V. et al. Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 12, n. 4, p. 293-298, 2009 2009. ISSN 1756-1841. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272127900005 >.

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. 192 (Phd). Física e Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

KABEYA, L. M. et al. Inhibition of immune complex-mediated neutrophil oxidative metabolism: A pharmacophore model for 3-phenylcoumarin derivatives using GRIND-based 3D-QSAR and 2D-QSAR procedures. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 996-1007, May 2008a. ISSN 0223-5234. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256570800012 >.

_____. Inhibition of immune complex-mediated neutrophil oxidative metabolism: a pharmacophore model for 3-phenylcoumarin derivatives using GRIND-based 3D-QSAR and 2D-QSAR procedures. **Eur J Med Chem**, v. 43, n. 5, p. 996-1007, May 2008b. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804122> >.

_____. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenyleoumarin derivatives: Synthesis and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1516-1524, Feb 2007. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243959100029 >.

_____. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 1, p. 63-75, Oct 2013. ISSN 0009-2797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326560700008 >.

KANASHIRO, A. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Phytother Res**, v. 18, n. 1, p. 61-5, Jan 2004. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750203> >.

_____. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 5, p. R1631-R1640, May 2009. ISSN 0363-6119. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266246900038 >.

KAO, J. P. Y.; LI, G.; AUSTON, D. A. Practical Aspects of Measuring Intracellular Calcium Signals with Fluorescent Indicators. **Calcium in Living Cells**, v. 99, p. 113-152, 2010 2010. ISSN 0091-679X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000284504900005 >.

KAPOOR, B. et al. Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis. **Scientific World Journal**, 2014 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000331319000001 >.

KARN, P. R.; CHO, W.; HWANG, S.-J. Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. **Nanomedicine**, v. 8, n. 9, p. 1529-1548, Sep 2013. ISSN 1743-5889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330528600019 >.

KASAHARA, Y. et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95(Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. **Blood**, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, Mar 1 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WK47700034 >.

KAWAKAMI, E. et al. The histone demethylase Fbxl11/Kdm2a plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. **Mechanisms of Development**, v. 135, p. 31-42, Feb 2015. ISSN 0925-4773. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000348033900003 >.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, Mar 2009. ISSN 0257-277X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264597400004 >.

KESHARI, R. S. et al. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 532-540, Mar 2013. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313900600006 >.

KHANDPUR, R. et al. NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 178, Mar 2013. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316795300004 >.

KHANNA, D. et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 344-351, Jun 2007. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247122900019 >.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 5, p. 761-772, Feb 2009. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263942200002 >.

KIRCHNER, T. et al. The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **Mediators of Inflammation**, 2012. ISSN 0962-9351. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302655700001 >.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185-198, Feb 2013. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314358100003 >.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309-333, Nov-Dec 2009. ISSN 1939-5094. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283710600004 >.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, Mar 2013. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://CCC:000316616100009 >.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 3, Mar 2015. ISSN 1553-7366. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352201900003 >.

KUIPER, J. W. P. et al. Rac regulates PtdInsP(3) signaling and the chemotactic compass through a redox-mediated feedback loop. **Blood**, v. 118, n. 23, p. 6164-6171, Dec 1 2011. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297757700026 >.

KUNDU, S. K. et al. Recent Trends of Polymer Mediated Liposomal Gene Delivery System. **Biomed Research International**, 2014 2014. ISSN 2314-6133. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000344669300001 >.

LANDI-LIBRANDI, A. P. et al. In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system. **J Microencapsul**, v. 28, n. 4, p. 258-67, 2011. ISSN 1464-5246. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21545317 >.

LASSING, I. et al. Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, n. 2, p. 331-348, Jul 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247407500011 >.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 431-436, Jan 11 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226315700032 >.

LAVASTRE, V. et al. Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): Involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins. **Clinical Immunology**, v. 104, n. 1, p. 40-48, Jul 2002. ISSN 1521-6616. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177341400005 >.

LAZAREVIC-PASTI, T.; LESKOVAC, A.; VASIC, V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 168-190, 2015. ISSN 1389-2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000359604700001 >.

LELIEFELD, P. H. C. et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Critical Care**, v. 20, Mar 23 2016. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000372786300001 >.

LEY, K.; SMITH, E.; STARK, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. **Immunologic Research**, v. 34, n. 3, p. 229-242, 2006 2006. ISSN 0257-277X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239070000004 >.

LU, J. et al. Crystal Structure of Fc gamma Receptor I and Its Implication in High Affinity gamma-Immunoglobulin Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40608-40613, Nov 25 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297315400021 >.

LUAN, Y.-Y. et al. Insights into the Apoptotic Death of Immune Cells in Sepsis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 35, n. 1, p. 17-22, Jan 1 2015. ISSN 1079-9907. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000351275300002 >.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015-2020, 1984.

LUCISANO-VALIM, Y. M. et al. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 47, n. 1, p. 53-8, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 1056-8719. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387939 >.

MAJKA, D. S. et al. Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 6, p. 801-807, Jun 2008. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255774400012 >.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838-854, Nov 2007. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250894900003 >.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 10, p. 1304-1310, Nov 15 2006. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242005400011 >.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, Aug 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293069600011 >.

MATOS, M. J. et al. Synthesis and Study of a Series of 3-Arylcoumarins as Potent and Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7127-7137, Oct 2011. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296205900009 >.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 9**, v. 9, p. 181-218, 2014 2014. ISSN 1553-4006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000336055900009 >.

MCCRACKEN, J. M. **Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease** H., A. L.-A. 2014.

MCNAMEE, K.; WILLIAMS, R.; SEED, M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 278-286, Jul 15 2015. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000355362500029 >.

METZLER, K. D. et al. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. **Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 883-896, Aug 7 2014. ISSN 2211-1247. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000341572200023 >.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. EFFECTS OF FLAVONOIDS ON IMMUNE AND INFLAMMATORY CELL FUNCTIONS. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1167-1179, Mar 17 1992. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HM25600001 >.

MOHAMMED, B. M. et al. Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 3131-3150, Aug 2013. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330521800016 >.

MOMOHARA, S. et al. Elastase from polymorphonuclear leukocyte in articular cartilage and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 16, n. 2, p. 133-139, Mar 1997. ISSN 0770-3198. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WQ37200002 >.

MOULDING, D. A.; HART, C. A.; EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil Fc gamma RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 6, p. 875-882, Jun 1999. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080881600023 >.

MULEY, M. M. et al. Neutrophil elastase induces inflammation and pain in mouse knee joints via activation of proteinase-activated receptor-2. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 766-777, Feb 2016. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000370005700012 >.

NANJUNDAIAH, S. M.; ASTRY, B.; MOUDGIL, K. D. Mediators of Inflammation-Induced Bone Damage in Arthritis and Their Control by Herbal Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314960900001 >.

NATARAJAN, V.; MADHAN, B.; TIKU, M. L. Intra-Articular Injections of Polyphenols Protect Articular Cartilage from Inflammation-Induced Degradation: Suggesting a Potential Role in Cartilage Therapeutics. **Plos One**, v. 10, n. 6, Jun 5 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000355652200015 >.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88-102, Oct 2007. ISSN 0105-2896. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000249429500008 >.

NICOLETTI, I. et al. A RAPID AND SIMPLE METHOD FOR MEASURING THYMOCYTE APOPTOSIS BY PROPIDIUM IODIDE STAINING AND FLOW-CYTOMETRY. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, Jun 3 1991. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FQ60900014 >.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, Dec 2013. ISSN 0167-4889. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329596200088 >.

NISHINAKA, Y. et al. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 1, p. 75-79, Sep 16 2011. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295395000014 >.

NONOSE, N. et al. Oral administration of curcumin (*Curcuma longa*) can attenuate the neutrophil inflammatory response in zymosan-induced arthritis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 727-734, Nov 2014. ISSN 0102-8650. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000345426500006 >.

NUNES, P. et al. STIM1 Juxtaposes ER to Phagosomes, Generating Ca²⁺ Hotspots that Boost Phagocytosis. **Current Biology**, v. 22, n. 21, p. 1990-1997, Nov 2012. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000311060200019 >.

NUNES, P.; DEMAUREX, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 1, p. 57-68, Jul 2010. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279356700007 >.

NUUTILA, J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface Fc gamma RI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 268-274, Jun 2010. ISSN 0951-7375. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277800900011 >.

O'SHEA, J. J.; LAURENCE, A.; MCINNES, I. B. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 3, p. 173-182, Mar 2013. ISSN 1759-4790. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316239800006 >.

OFLAHERTY, J. T. et al. ROLES OF CA²⁺ IN HUMAN NEUTROPHIL RESPONSES TO RECEPTOR AGONISTS. **Biochemical Journal**, v. 277, p. 705-711, Aug 1 1991. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991GA37200022 >.

OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F. B. T. Preparation of 100nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine, using ethanol injection method. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 133, p. 69-78, 2005.

OLMEDO, D. et al. 3-Phenylcoumarins as Inhibitors of HIV-1 Replication. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9245-9257, Aug 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000308211100039 >.

PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241-1250, Sep 2011. ISSN 1567-5769. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294877600014 >.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Fc gamma and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015 2015. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000359572800001 >.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677-691, Nov 2010. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284135700021 >.

PAREKH, A. B.; PUTNEY, J. W. Store-operated calcium channels. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 757-810, Apr 2005. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227854700008 >.

PATIL, P. O. et al. A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 2434-2450, May 1 2013. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317403200001 >.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, Oct 2015. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363002300011 >.

PAULSSON, J. M.; JACOBSON, S. H.; LUNDAHL, J. Neutrophil activation during transmigration in vivo and in vitro A translational study using the skin chamber model. **Journal of Immunological Methods**, v. 361, n. 1-2, p. 82-88, Sep 30 2010. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283896800009 >.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v. 55, n. 11, p. 457-464, Nov 2006. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242299400001 >.

PETRY, A.; WEITNAUER, M.; GORLACH, A. Receptor Activation of NADPH Oxidases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 4, p. 467-487, Aug 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279428700007 >.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541-550, Jul 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238529900012 >.

PHILLIPS, D. C. et al. Aberrant Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generation in Rheumatoid Arthritis (RA): Causes and Consequences for Immune Function, Cell Survival, and Therapeutic Intervention. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 6, p. 743-785, Mar 2010. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275049500005 >.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, Jul 2000. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088562000038 >.

PILLAY, J. et al. In vivo labeling with (H²O)-H-2 reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 625-627, Jul 29 2010. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280502800019 >.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-465, Feb 21 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181252600005 >.

POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166-180, Mar 2014. ISSN 1474-1733; 1474-1741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000332019100012 >.

POULOS, T. L.; KRAUT, J. THE STEREOCHEMISTRY OF PEROXIDASE CATALYSIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 17, p. 8199-8205, 1980. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1980KH37400038 >.

PRUCHNIAK, M. P.; KOTULA, I.; MANDA-HANDZLIK, A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. **Central European Journal of Immunology**, v. 40, n. 2, p. 217-224, 2015 2015. ISSN 1426-3912. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000358822600014 >.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical Science**, v. 111, n. 1, p. 1-20, Jul 2006. ISSN 0143-5221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000238802000001 >.

RADSTAKE, T. et al. The functional variant of the inhibitory Fc gamma receptor IIb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell function in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 12, p. 3828-3837, Dec 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242780700015 >.

RANDIS, T. M. et al. Role of PI3K delta and PI3K gamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 5, p. 1215-1224, May 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256073400005 >.

RAZA, K. et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 4, 2006 2006. ISSN 1478-6354. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000240985200046 >.

REEVES, E. P. et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 291-297, Mar 21 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000174482200034 >.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006 2006. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251155400048 >.

RICHTER, J. et al. TUMOR NECROSIS FACTOR-INDUCED DEGRANULATION IN ADHERENT HUMAN NEUTROPHILS IS DEPENDENT ON CD11B/CD18-INTEGRIN-TRIGGERED OSCILLATIONS OF CYTOSOLIC FREE CA²⁺. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 23, p. 9472-9476, Dec 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EL36600083 >.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, Sep 2010. ISSN 1529-2908. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281115500006 >.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell migration. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 15, p. 2713-2722, Aug 2001. ISSN 0021-9533. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170562300002 >.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704-1709, Dec 5 2003. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186970100033 >.

ROBINSON, J. J. et al. STIMULATION OF NEUTROPHILS BY INSOLUBLE IMMUNOGLOBULIN AGGREGATES FROM SYNOVIAL-FLUID OF PATIENTS WITH RHEUMATOID-ARTHRITIS. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 5, p. 314-318, May 1992. ISSN 0014-2972. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HR32200003 >.

ROHM, M. et al. NADPH Oxidase Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pulmonary Aspergillosis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 1766-1777, May 2014. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000334666200003 >.

ROLLET-LABELLE, E. et al. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 4, p. 563-572, Mar 1 1998. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000072770800007 >.

ROUSSAKI, M. et al. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 13, p. 3889-3892, Jul 1 2010. ISSN 0960-894X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278644700012 >.

SAKAI, J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1037-1049, Dec 2012. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000312575000012 >.

SANGALETTI, S. et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3007-3018, Oct 11 2012. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000311619300018 >.

SANTOS, M. D. S. et al. In situ screening of 3-aryl coumarin derivatives reveals new inhibitors of mast cell degranulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 6, p. 731-738, Jun 2013. ISSN 0253-6269. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320003700009 >.

SASHIDHARA, K. V. et al. Discovery and synthesis of novel 3-phenyl coumarin derivatives as antidepressant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 1937-1941, Apr 2011. ISSN 0960-894X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000288245100006 >.

_____. Synthesis and evaluation of new 3-phenyl coumarin derivatives as potential antidepressant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 20, p. 4876-4880, Oct 15 2014. ISSN 0960-894X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342575200021 >.

SCHAFF, U. Y. et al. Calcium flux in neutrophils synchronizes beta(2) integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 4, p. 632-646, Apr 2008. ISSN 0090-6964. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254176000014 >.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 515-521, May 2014. ISSN 1078-8956; 1546-170X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335710700022 >.

SCHMIDT, A. et al. Neutrophil elastase-mediated increase in airway temperature during inflammation. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 13, n. 6, p. 623-631, Dec 2014. ISSN 1569-1993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000345724200006 >.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228947000007 >.

SERRANDER, L.; FALLMAN, M.; STENDAHL, O. Activation of phospholipase D is an early event in integrin-mediated signalling leading to phagocytosis in human neutrophils. **Inflammation**, v. 20, n. 4, p. 439-450, Aug 1996. ISSN 0360-3997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VE25700009 >.

SKATTUM, L. et al. Complement deficiency states and associated infections. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 14, p. 1643-1655, Aug 2011. ISSN 0161-5890. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294096100007 >.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 473-488, Jun 2003. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183128300017>.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-439, Jun 2010. ISSN 1474-1733. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277990100013>.

SOUBHYE, J. et al. Structure-Based Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of 3-(Aminoalkyl)-5-fluoroindoles as Myeloperoxidase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8747-8759, Dec 2010. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000285264300027>.

SOUTO, F. O. et al. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB₄, and fMLP: Inhibition of Actin Polymerization. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 2, p. 113-118, Feb 2011. ISSN 0163-3864. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287637300001>.

STAPELS, D. A. C.; GEISBRECHT, B. V.; ROOIJAKKERS, S. H. M. Neutrophil serine proteases in antibacterial defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 42-48, Feb 2015. ISSN 1369-5274. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000349879800008>.

STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285-294, Mar 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228105700004>.

STEINCKWICH, N. et al. Potent inhibition of store-operated Ca²⁺ influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 4, p. 1054-1064, Apr 2007. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245458000023>.

STOIBER, W. et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 702-723, Jun 2015. ISSN 2218-273X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000357640800020>.

STRYDOM, N.; RANKIN, S. M. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 4, p. 304-314, 2013. ISSN 1662-811X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320682100002>.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis: Elegant complexity. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 539-550, May 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229447200004>.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318-324, Aug 2010. ISSN 1471-4906. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000281177300005>.

SURI, S. et al. A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 645-653, Sep 2008. ISSN 0006-2952. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258843700008>.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86-92, Feb 1997. ISSN 0955-0674. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WF59700013>.

TAWATA, M. et al. ANTIPLATETLET ACTION OF GU-7, A 3-ARYLCOUMARIN DERIVATIVE, PURIFIED FROM GLYCYRRHIZAE RADIX. **Planta Medica**, v. 56, n. 3, p. 259-263, Jun 1990. ISSN 0032-0943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DK71300003>.

TIBREWAL, S. et al. Hyperosmolar Stress Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation: Implications for Dry Eye Disease. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 12, p.

7961-7969, Dec 2014. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347222300027 >.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, Feb 2005. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226721500020 >.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan 2010. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273412900020 >.

TUNALI, T. et al. 6,7-dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. **British Journal of Haematology**, v. 126, n. 2, p. 226-230, Jul 2004. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222356200008 >.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A STUDY OF SOME VARIABLES IN A TETRAZOLIUM DYE (MTT) BASED ASSAY FOR CELL-GROWTH AND CHEMOSENSITIVITY. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-285, Sep 1987. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987K126500006 >.

UMAR, S. et al. Hesperidin inhibits collagen-induced arthritis possibly through suppression of free radical load and reduction in neutrophil activation and infiltration. **Rheumatology International**, v. 33, n. 3, p. 657-663, Mar 2013. ISSN 0172-8172. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315290900017 >.

UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S. Information processing during phagocytosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 7, p. 492-502, Jul 2012. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305803000009 >.

VAN ACKER, S. et al. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 935-943, Oct 15 1998. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000076222900003 >.

VAN DEN HOVEN, J. M. et al. Liposomal Drug Formulations in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1002-1015, Jul-Aug 2011. ISSN 1543-8384. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293307400003 >.

VAN DER POEL, C. E. et al. Functional Characteristics of the High Affinity IgG Receptor, Fc gamma RI. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 2699-2704, Mar 1 2011. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287356900003 >.

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. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, Nov 2009. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270829600015 >.

VAN KESSEL, K. P. M.; BESTEBROER, J.; VAN STRIJP, J. A. G. Neutrophil-mediated phagocytosis of Staphylococcus aureus. **Frontiers in Immunology**, v. 5, Sep 26 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000354451400001 >.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-190, Sep 21 2000. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089562500014 >.

VETHANAYAGAM, R. R. et al. Role of NADPH Oxidase versus Neutrophil Proteases in Antimicrobial Host Defense. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 9, Dec 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298161900017 >.

VONGSAK, B. et al. In Vitro Inhibitory Effects of Moringa oleifera Leaf Extract and Its Major Components on Chemiluminescence and Chemotactic Activity of Phagocytes. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 11, p. 1559-1561, Nov 2013. ISSN 1934-578X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000326859300015 >.

VOROBJEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 208-219, Feb 2016. ISSN 0171-2985. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000369046700012 >.

VUOTTO, M. L. et al. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 399-405, Mar 2003. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182414200017 >.

WANG, K. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis or necrosis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, n. 8, p. 351-356, Oct 2014. ISSN 0940-2993. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000341679100001 >.

WILLIAMS, M. R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 461-469, Oct 2011. ISSN 1471-4906. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000296987300003 >.

WILSSON, A. et al. Killing of phagocytosed Staphylococcus aureus by human neutrophils requires intracellular free calcium. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 6, p. 902-907, Jun 1996. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UV31300018 >.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-660, Feb 2013. ISSN 1523-0864.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, Sep 2010. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280904400004 >.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 593-601, Oct 2014. ISSN 1759-4790. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342964700004 >.

XU, J. S. et al. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 201-214, Jul 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184378700010 >.

YAMADA, A. N. et al. Anti-inflammatory Activity of Ocimum americanum L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 4, p. 913-926, 2013 2013. ISSN 0192-415X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000322444500013 >.

YUKARI NISHIMURA, F. D. C. et al. Antioxidant Effects of Quercetin and Naringenin Are Associated with Impaired Neutrophil Microbicidal Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000322638000001 >.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 3, p. 277-284, 2013 2013. ISSN 0001-527X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000325237000002 >.

ZHANG, D. et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 528-+, Sep 24 2015. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000361599900052 >.

ZHANG, H. et al. STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2238-2249, Apr 3 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335889600021 >.

_____. STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. **Blood**, v. 123, n. 14, p. 2238-2249, Apr 2014. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000335889600021 >.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Farmagnosia: da planta ao medicamento**. 5. Porto Alegre/Florianópolis: 2004.

APÊNDICES

Apêndice 1. Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fcγ e/ou CR, utilizando diferentes tipos de IC precipitados formados de: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN e F(ab')₂-OVA/SHN, e também o estímulo solúvel PMA.

Nos ensaios de QLlum, na ausência de tratamento das células com o derivado 3-fenilcumarínico, foi obtido um padrão de resposta no qual a produção de quimioluminescência foi maior quando os receptores para a porção cristalizável dos anticorpos de classe G (FcγR) e os receptores do complemento (CR) estavam sendo ativados ao mesmo tempo. Em seguida a célula produziu mais QL quando foi estimulada via o FcγR somente, seguida pela ativação com o estímulo solúvel PMA e por último quando foi estimulada via CR3 somente. Já nos ensaios de QLluc, a célula produziu mais ERO quando foi estimulada, ao mesmo tempo, com os dois receptores dependentes de opsonização. Para os demais estímulos a resposta foi menor e igual entre eles (figura 1.1).

Figura 1.1: Área integrada de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados com diferentes tipos de imunocomplexos precipitados e também o estímulo solúvel PMA: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram estimulados com diferentes estímulos IC precipitados: IgG-OVA, IgG-OVA/SHN, $F(ab')_2$ -OVA/SHN ($60 \mu\text{g/ml}$) e também PMA (10^{-7} mol/L), e imediatamente, mediu-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro de placa. **a)** QLlum e **b)** QLluc. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes. **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

Apêndice 2. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados:

2.1. Preparo e caracterização físico-química dos lipossomas (LUV):

O método de injeção etanólica descrito por (Batzri e Korin, 1975) modificado por (Oliveira, Machado e Pessine, 2005), escolhido nesta investigação, possui algumas vantagens uma vez que é muito simples, de baixo custo e produz preparações lipossomais razoavelmente homogêneas, como revelado pelas técnicas de determinação de tamanho. Além disto, pode ser aplicado para produção de vesículas em larga escala (Pons, Foradada e Estelrich, 1993).

Neste estudo, vesículas foram preparadas usando fosfatidilcolina hidrogenada de soja e colesterol (PC:CHOL) na proporções de massa de 5:1, e o efeito desta composição lipídica nas características físico-químicas e na eficiência de incorporação do derivado 3-fenilcumarínico foi avaliado. PC foi utilizada uma vez que é uma lecitina natural com alta estabilidade e biocompatibilidade, produzindo vesículas mais resistentes à oxidação (Justo e Moraes, 2005). CHOL foi também empregado nas preparações para aumentar a hidrofobicidade das vesículas considerando a habilidade desse composto de interagir com fosfolípidos e substituir o CHOL sem afetar as funções da membrana, mesmo quando presente nos lipossomas (Demel *et al.*, 1984; Lala e Kumari, 1988). Este aumento de hidrofobicidade da vesícula pode ser importante no sentido de promover maior eficiência de incorporação de compostos fenólicos, os quais apresentam baixa solubilidade em água.

A caracterização físico-química das vesículas foi realizada através da determinação do tamanho da partícula lipossomal, do índice de polidispersão (Pdl) e da eficiência de incorporação (EI) do composto fenólico. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Caracterização físico-química de lipossomas compostos de PC:CHOL na proporção de massa de 5:1, vazios e contendo C13, pela determinação do tamanho, índice de polidispersão (PdI), Potencial Zeta e Eficiência de Incorporação (EI).

Parâmetros ^(a)	LUV PC:CHOL 5:1	
	Vazio	C13
Tamanho (nm)	120,6 ± 3,97	138,3 ± 5,90*
PdI	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,02*
Potencial Zeta (mV)	-0,28 ± 0,14	-0,06 ± 0,09
EI (%)	————	48,15 ± 6,58

^(a) Valores representam a média ± desvio padrão de no mínimo três preparações lipossomais com medidas em duplicata. **Análise estatística:** *p<0,05 vs vazio (teste *t* de student).

2.2. Determinação da Eficiência de Incorporação do derivado 3-fenilcumarínico (C13) nas vesículas lipossomais:

Primeiramente, foi obtido o espectro de varredura no UV-visível da C13 (ver figura 2.1) com o objetivo de determinar o comprimento de onda onde a absorbância é máxima, o qual foi utilizado posteriormente para determinação da quantidade de C13 incorporada pelos LUV. Como pode ser observado, o comprimento de onda de 375 nm foi selecionado.

Em seguida, uma curva de calibração foi construída para a C13, a qual foi utilizada para calcular a concentração do derivado 3-fenilcumarínico incorporado, empregando o valor obtido do coeficiente de absortividade molar (ver figura 2.2).

Após o preparo, os LUV obtidos foram rompidos com álcool etílico absoluto na proporção 1:3 e a concentração da C13 encapsulada foi determinada com base na medida da absorbância em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda específico determinado para a C13 (375 nm). Consequentemente, a eficiência de incorporação foi determinada.

Figura 2.1. Espectro de varredura obtido do Derivado 3-fenilcumarínico C13 a 50 µmol/L em álcool etílico absoluto.

A incorporação da C13 pelas vesículas preparadas promoveu uma leve alteração no tamanho das mesmas, uma vez que o diâmetro dos lipossomas contendo a C13 ($138,3 \pm 5,90$ nm) foi maior do que o diâmetro das estruturas vazias ($120,6 \pm 3,97$ nm). Além disso, o Índice de Polidispersão também foi diferente ($0,22 \pm 0,01$), para LUV vazio e $0,29 \pm 0,02$ para o LUV com a C13 (ver tabela 2.1). Em relação à Eficiência de Incorporação da C13 pelos nanocarreadores, uma porcentagem de incorporação de aproximadamente 50% foi alcançada.

Este resultado é muito semelhante aos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa para a incorporação do flavonóide quercetina.

Figura 2.2. Curva de calibração da C13 e seu coeficiente de absorvidade molar (ϵ): $\epsilon = 18.44 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, incorporado em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com IC precipitados formados de IgG-OVA:

O derivado 3-fenilcumarínico, na forma livre, apresentou CI_{50} de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/L}$ na QL de neutrófilos humanos estimulados via $Fc\gamma R$. Esses experimentos foram realizados por meio de ensaios de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e lucigenina (QLluc). No intuito de uma futura aplicação dessa substância como terapia em doenças com participação ativa dos neutrófilos, o derivado 3-fenilcumarínico foi incorporado em lipossomas (C13 LUV), e avaliados frente ao metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC formados de IgG-OVA. Ela foi avaliada em diferentes concentrações, no intuito de verificar se o efeito inibitório da QLlum e QLluc, verificado anteriormente, se mantém quando a mesma é incorporada em lipossomas, e se esse efeito continua sendo dependente de concentração.

Na figura 2.3 pode-se verificar os perfis cinéticos de QLlum e QLluc, como também os valores de área integrada referente e a porcentagem de inibição, mostrando que a C13 LUV, manteve o mesmo padrão de inibição da QL da forma livre. A porcentagem de inibição da QLlum pela C13 LUV obedeceu a seguinte ordem: $1,05 \pm 0,16$ (C13 livre) < $3,08 \pm 0,52$ (C13 LUV). Já para a QLluc, o padrão de inibição foi: $1,28 \pm 0,05$ (C13 livre) < $5,66 \pm 1,23$ (C13 LUV). Esses valores podem ser conferidos na tabela 2.4.

De um modo geral, o potencial inibitório da C13 na forma livre é maior do que o efeito da C13 LUV. No entanto, o CI_{50} da C13 LUV, apesar de ser estatisticamente diferente do CI_{50} da C13 livre, não é um valor muito elevado, mostrando que a incorporação da C13 no lipossoma não afetou a capacidade dessa substância de modular o metabolismo oxidativo de neutrófilos *in vitro*. Assim, a incorporação pode ser usada como ferramenta para aumentar a biodisponibilidade do composto, como também à estabilidade. Essas características são importantes e necessárias para uma possível aplicação terapêutica da C13.

Figura 2.3: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e de lucigenina (QLluc) de neutrófilos humanos estimulados via $Fc\gamma R$ por meio de imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA - Efeito inibitório da C13, incorporada em lipossomas: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (3 min, $37^\circ C$) com a C13 (0,02 – 20 $\mu\text{mol/L}$), incorporada em lipossomas, DMSO (controle solvente) incorporado em lipossomas, ou HBSS suplementado com 0,2% de gelatina. As células foram estimuladas com IC: IgG-OVA (60 $\mu\text{g/ml}$), medindo-se a QL (15 min, $37^\circ C$) em Luminômetro de placa. **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum e QLluc com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum e QLluc; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum e QLluc calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas (E). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Abreviaturas:** E: espontâneo; **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

Tabela 2.1: Inibição da QLlum e da QLluc pelo derivado 3-fenilcumarínico, livre e incorporada em lipossomas, representado pelo valor de CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$), para neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos precipitados formados de IgG-OVA (a).

	IgG-OVA	
	QLlum	QLluc
C13	$1,05 \pm 0,16^a$	$1,28 \pm 0,05^{x*}$
C13 LUV	$3,08 \pm 0,52^b$	$5,66 \pm 1,23^{y*}$

(a) Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** valores com letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). *diferença estatística entre os valores de uma mesma linha ($p < 0,05$; teste t de Student não pareado). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

1.4. Avaliação do efeito do derivado 3-fenilcumarínico C13, livre e incorporada em lipossomas, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com IC imobilizados formados de IgG-OVA:

No intuito de uma futura aplicação dessa substância como terapia em doenças com deposição de imunocomplexos e participação ativa dos neutrófilos, o derivado 3-fenilcumarínico, livre ou incorporado em lipossomas (C13 LUV), foi avaliado sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC imobilizados formados de IgG-OVA. Ele foi avaliado nas concentrações dos CI_{50} da forma livre, ou da forma incorporada em lipossomas, 1 e 3 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

Observando a figura 2.4 verifica-se que a C13, tanto da forma livre como na forma incorporada nos lipossomas, é capaz de inibir o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC imobilizados. Além disso, constatou-se que, as duas formas de tratamentos oferecidos às células pela C13, inibiram cerca de 80% à QLlum. Isso pode ser visto melhor na figura 2.4, onde é comparada a área integrada da QLlum para os diferentes estímulos e diferentes formas de preparação da C13.

Esses resultados mostram que a C13 foi mais eficiente em inibir a QLlum de neutrófilos estimulados com IC imobilizados do que de neutrófilos estimulados com IC precipitados, já que nesse último caso os valores utilizados inibiram cerca de 50%, apenas.

Figura 2.4: Quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) de neutrófilos humanos estimulados via FcγR por meio de imunocomplexos imobilizados formados de IgG-OVA - Comparação do efeito inibitório da C13, na forma livre e incorporada em lipossomas: Neutrófilos (1×10^6 ml) foram tratados (3 min, 37°C) com a C13 (1 μ mol/L), livre (1) ou incorporada em lipossomas (1 LUV); DMSO (controle solvente), livre (DMSO) ou incorporado em lipossomas (DMSO LUV); ou HBSS suplementado com 0,2% de gelatina (E). As células foram estimuladas com IC (IgG-OVA) imobilizados às placas próprias para luminômetro, medindo-se a QL (15 min, 37°C). **a)** Perfis cinéticos representativos de QLlum com medidas da produção de fótons por minuto; **b)** Área integrada de QLlum; **c)** Porcentagem de Inibição de QLlum calculada em relação ao DMSO 0,1% (controle solvente). As células incubadas com HBSS não foram estimuladas (E). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Abreviaturas:** E: espontâneo; QLlum: quimioluminescência dependente de luminol; DMSO LUV: DMSO incorporado no lipossoma; 3 LUV: C13, na concentração de 3 μ mol/L, incorporada no lipossoma; OVA: ovoalbumina.

Anexo A: Comprovante de Aprovação do Protocolo de Pesquisa com animais pelo CEUA da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto (Procedimento com os Coelhos)

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

Anexo B: Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 007/2013
kms

Ribeirão Preto, 28 de março de 2013.

À
Prof^a. Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim
Pós-graduando Micássio
FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADOS 3-FENILCUMARÍNICOS EM NEUTRÓFILOS HUMANOS ESTIMULADOS E EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 293, foi analisado e **aprovado** "ad referendum" do CEP, conforme parecer consubstanciado emitido através da Plataforma Brasil.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos 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.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo C: Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFRP-USP (Procedimentos com os Ratos Wistar)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação in vitro dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório de derivados 3-fenilcumarínicos em neutrófilos humanos estimulados e em modelo animal de artrite", protocolo nº 15.1.333.60.0, sob a responsabilidade de Micássio Fernandes de Andrade e Yara Maria Lucisano Valim que envolve a manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Prefeitura de Campus de Ribeirão Preto (CEUA PUSP-RP) na Reunião Ordinária da CEUA de 31/07/2015.

Colaboradores: Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini

Vigência do Projeto	01/07/2015 a 31/05/2016
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	90
Peso	180 - 220g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Presidente da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892