UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos
no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por
complexos imunes.

Micássio Fernandes de Andrade

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos
no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por
complexos imunes.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada para
obtenção do Título de Mestre em
Imunologia

Aluno: Micássio Fernandes de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria
Lucisano-Valim

Ribeirão Preto
2012

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 da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por complexos imunes. Ribeirão Preto, 2012.

88 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Lucisano-Valim, Yara Maria

1. Neutrófilos. 2. Imunocomplexos. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Fenilcumarinas. 5. Antioxidante.

ANDRADE, M. F. Estudo da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por complexos imunes.
Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimientos

A Deus, pela força e disposição que me foram concedidas para a realização desta pesquisa.

À minha família, principalmente meus avós Apolônio e Francisca, minha mãe Irene, meus tios Francisca e Francisco e meus irmãos Maciel e Maria Inês, 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 pós-doutoranda Dra. Luciana Mariko Kabeya, pela atenção e apoio durante o desenvolvimento dos experimentos e elaboração desta dissertação.

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

Aos professores do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Augusto César Cropanese Spadaro, Carem Gledes Vargas Recchia, Carlos Curti, Carolina Patrícia Aires e Luciane Carla Alberice, por colocarem à disposição a área experimental e o laboratório.

Às pós-doutorandas Dra. Adriana B. P. Paschoalato, Dra. Ana Paula Landi Librandi e Dra. Larissa F. Marchi, pela amizade e apoio científico e intelectual.

Aos pós-graduandos Andréa S. G. Figueiredo-Rinhel, Everton O. L. dos Santos, Isabel C. C. Vigato, Juliana E. T. Kawahisa e Taís N. Chrysóstomo, pela amizade, momentos de reflexão e discussão dos experimentos.

Aos alunos de Iniciação Científica Débora M. Berchielli, Eduardo J. Fusse, Fabiana Piatesi, Júlia Ribeiro (*in memoriam*), Marcela F. C. Cruz, e Marcia A. Okuro, pela amizade e convivência agradável.

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.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP Agnaldo B. da Silva, Ana Cristina M. Pollizelo, Denise C. Damasceno e Ieda Maria R. Prado, pela convivência agradável.

Aos professores Dr. Flavio da Silva Emery e Dra. Monica Tallarico Pupo da FCFRP-USP, pela síntese das substâncias estudadas.

Ao aluno de Iniciação Científica Márcio Roberto P. Paris do laboratório de química medicinal da FCFRP-USP, pela síntese das substâncias estudadas.

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

Aos amigos Bruno Cesar Pereira e Ana Paula Barreto de Paiva, pela amizade sincera, convivência agradável e pelo incentivo na realização desta etapa de formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo 131780/2010-7).

Resumo

ANDRADE, M. F. **Estudo da atividade antioxidante de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por complexos imunes.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos neutrófilos, que representa um mecanismo essencial da imunidade inata contra agentes infecciosos, pode ser desencadeada por imunocomplexos (IC) associados ou não com componentes do sistema complemento. Os IC são normalmente eliminados da circulação pela ligação aos receptores de complemento do tipo 1 em eritrócitos, que os transportam até o baço e o fígado, onde são fagocitados por macrófagos residentes. Porém, defeitos neste mecanismo de eliminação podem levar à deposição de IC nos vasos e tecidos. Em algumas doenças inflamatórias, onde ocorre uma intensa deposição de IC, pode acontecer o recrutamento e a ativação maciça de neutrófilos pelos IC. Nessa situação, os mecanismos endógenos de defesa tecidual não conseguem controlar as alterações desencadeadas pelos fatores oxidantes e líticos liberados pelos neutrófilos, levando à possível lesão tecidual e consequências funcionais e estruturais para o organismo.

Nessa perspectiva, tem-se intensificado, nos últimos anos, a procura por novos compostos terapêuticos com capacidade de reduzir os danos aos tecidos adjacentes ao acúmulo de IC, neutrófilos, ERO e enzimas líticas, expostos a níveis deletérios desses componentes. Assim, neste trabalho foi avaliado o potencial antioxidante de um conjunto de dez derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por ICs, empregando-se o ensaio de quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina (QLlum e QLluc, respectivamente). Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade das amostras, através do ensaio de exclusão do azul de tripan e medida da atividade da lactato desidrogenase liberada, bem como sua capacidade de sequestrar HOCl e inibir a atividade das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase (MPO).

Observou-se que todas as amostras avaliadas inibiram a QLlum e a QLluc, sendo que cinco delas tiveram efeito inibitório maior que ou igual a 50% (**C6**, **C13**, **C13a**, **C24** e **C24a**)*. Este efeito biológico não foi mediado pela citotoxicidade das 3-fenilcumarinas, nas condições avaliadas. Dentre essas amostras, o derivado 3-fenilcumarínico **C13**, que foi o mais efetivo em inibir a QLluc, possui duas características que parecem estar relacionadas com tal efeito: um grupo substituinte orto-diidroxí no esqueleto cumarínico e um grupo metilenodioxila no anel fenílico. Além do mais, todas as substâncias que

possuem o grupo metilenodioxila no anel fenílico (**C1**, **C6**, **C6a**, **C13**, **C13a**) apresentaram efeito inibitório da QLuc maior que as respectivas análogas sem este substituinte (**C15**, **C18**, **C18a**, **C24**, **C24a**). A inibição da QLuc parece ser independente da inibição da atividade da NADPH oxidase, visto que as substâncias apresentaram efeito inibitório discreto no consumo de O₂ pelos neutrófilos estimulados por IC. Por outro lado, as amostras **C13** e **C24**, que têm em comum a presença do grupo substituinte 6,7-diidroxil, apresentaram os maiores efeitos inibitórios sobre a QLuc, apresentando IC₅₀ semelhante. Essas duas substâncias também foram as mais ativas em inibir a atividade da enzima MPO e em sequestrar o HOCl. Para esses dois ensaios, a atividade biológica observada foi dependente do número de hidroxilas na estrutura do derivado 3-fenilcumarínico.

Os resultados deste trabalho mostram que a atividade antioxidante dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos está relacionada às características estruturais dessas moléculas. Dentre a série de substâncias avaliadas, **C13** e **C24** são as amostras mais promissoras para uso como protótipos de moléculas com aplicação terapêutica na modulação desta função neutrofílica.

* ver figura 3.1., pág. 42 - Nomenclatura e estrutura química das substâncias estudadas.

Palavras-chave: neutrófilos, imunocomplexos, espécies reativas de oxigênio, fenilcumarinas, antioxidante.

Abstract

ANDRADE, M. F. **Study of the antioxidant activity of 3-phenylcoumarin derivatives in the oxidative metabolism of human neutrophils stimulated with immune complexes.** 2012. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Production of reactive oxygen species (ROS) by neutrophils, which is an essential mechanism of innate immunity against infectious agents, can be triggered by immune complexes (IC) associated or not with components of the complement system. IC are normally cleared from the circulation by binding to complement receptor type 1 on erythrocytes and transport to spleen and liver, where they are phagocytized by resident macrophages. However, defects in this clearance mechanism can lead to deposition of IC in vessels and tissues, favoring neutrophil chemotaxis. In some inflammatory diseases there is intense deposition of IC, which triggers massive recruitment and activation of neutrophils. In these situations, the endogenous tissue defense mechanisms are not able to regulate the local disorders provoked by the oxidant and lytic compounds released by neutrophils, and tissue damage as well as structural and functional consequences to the organism might occur.

In this perspective, the last years have been marked by an intense search for new therapeutic compounds able to reduce the damage to tissues surrounding the site of accumulation of IC, neutrophils, ROS and lytic enzymes, exposed to deleterious levels of these components. So, the present work reports the evaluation of the antioxidant potential of ten 3-phenylcoumarin derivatives in the neutrophil oxidative metabolism stimulated with IC, through the luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence assay (QLlum and QLluc, respectively). Further, cytotoxicity of the samples was evaluated by the trypan blue exclusion assay and measurement of lactate dehydrogenase activity, as well as their ability to scavenge HOCl and inhibit NADPH-oxidase and myeloperoxidase (MPO) activity.

We found that all the samples inhibited QL-lum and QLluc, being the inhibitory effect of five of them higher than or equal to 50% (**C6, C13, C13a, C24 e C24a**)*. This biological effect was not mediated by cytotoxicity of the 3-phenylcoumarins, under the conditions assessed. Compound **C13**, which was the most effective inhibitor of QLluc among the set of phenylcoumarins tested, has two structural features that seem to be related to this effect: an orto-dihydroxyl group in the coumarin moiety and a methylenedioxy group attached to the phenyl ring. Moreover, the inhibitory effect of all 3-

phenylcoumarins bearing the methylenedioxy group (**C1**, **C6**, **C6a**, **C13**, **C13a**) was higher than that found to their analogues without this group (**C15**, **C18**, **C18a**, **C24**, **C24a**). The CLluc inhibition by phenylcoumarins seems to be independent of inhibition of NADPH-oxidase activity, since these compounds had a slight inhibitory effect in the O₂ consumption by IC-stimulated neutrophils. On the other hand, compounds **C13** and **C24**, which shares the 6,7-dihydroxyl group, had the highest inhibitory effects on CLluc with similar IC₅₀ values among the samples tested. These compounds were also the most active ones to inhibit MPO activity and scavenge HOCl. Such biological effects were dependent on the number of hydroxyl groups in the 3-phenylcoumarin moiety.

The results of this work show that the antioxidant activity of 3-phenylcoumarin derivatives in the oxidative metabolism of human neutrophils is related to the structural characteristics of these molecules. Among the set of compounds evaluated, **C13** and **C24** are the most promising samples to be used as prototypes of molecule with therapeutic application in the modulation of neutrophil function.

*see figure 3.1., pp. 42 – Nomenclature and chemical structure of the tested compounds.

Key words: neutrophils, immune complexes, reactive oxygen species, phenylcoumarins, antioxidant.

ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina tri-fosfato
CAT	catalase
C3b, C3bi	fragmentos de ativação do sistema complemento
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
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
Fc γ R	receptor para a porção Fc de IgG
Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb	isoformas de receptores Fc γ
gp91 ^{phox} /NOX2	glicoproteína de 91 kDa, componente do complexo da NADPH oxidase
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GPI	glicosil fosfatidilinositol
GDP	guanosina bi-fosfato
GPO	glutationala peroxidase
GSH	glutationala reduzida

GSSH	glutathiona oxidada
GTP	guanosina tri-fosfato
HRP	<i>horseradish</i> peroxidase
IC	imunocomplexo (s)
IC IgG-OVA	imunocomplexo de ovalbumina e IgG anti-ovalbumina
IC ₅₀	concentração que inibe 50% da resposta biológica
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN γ	interferon γ
IgG	imunoglobulina da classe G
IL-6, IL-12	interleucinas 6 e 12
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
M.M.	massa molecular
MPO	mieloperoxidase
m/v	massa/volume
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
n-fMLP	n-formil-metionil-leucil-fenilalanina
NF- κ B	fator nuclear de transcrição κ B
OVA	ovalbumina
PI3-K	fosfatidilinositol 3-kinase
PSGL-1	ligante 1 da glicoproteína P-selectina
PtdInsP	fosfatidilinositol

PtdInsP2	fosfatidilinositol bi-fosfato
PtdInsP3	fosfatidilinositol tri-fosfato
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
phox	oxidase de fagócitos
PMA	acetato de miristoilforbol
QL	quimioluminescência
QLluc	quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum	quimioluminescência dependente de luminol
QUER	quercetina
R _F	fator de retardamento
T _H 2	células T helper do padrão de resposta 2
S/d	sem diluir; não diluído
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLPI	inibidor de protease secretória de leucócitos
SOD	superóxido dismutase
Src	família de proteínas tirosinas quinases
TNF α	fator de necrose tumoral tipo α
v/v	volume/volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Características e funções gerais dos neutrófilos.....	21
1.2. Grânulos: produção e liberação.....	22
1.3. Fagocitose	24
1.4. Receptores de membrana	25
1.4.1. Receptores Fc γ	25
1.4.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento	26
1.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	27
1.5.1. NADPH oxidase	28
1.5.2. Mieloperoxidase	29
1.6. Neutrófilos e doenças causadas por deposição de imunocomplexos.....	32
1.7. Cumarinas	33
1.7.1. Derivados 3-fenilcumarínicos	34
2. OBJETIVOS	36
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
3.1. Sujeitos da pesquisa	39
3.2. Colheita de sangue e purificação de neutrófilos humanos	39
3.3. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos.....	39
3.3.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti-OVA.....	39
3.3.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA.....	40
3.3.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	41
3.3.4. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo	41
3.4. Síntese dos derivados 3-fenilcumarínicos utilizados no estudo.....	42
3.5. Avaliação da solubilidade dos derivados 3-fenilcumarínicos em meio aquoso	43
3.6. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 3-fenilcumarínicos.....	44
3.7. Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fc gama.....	44

3.8. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima NADPH oxidase	46
3.9. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima mieloperoxidase.....	46
3.10. Avaliação da atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos	47
3.11. Análise de dados	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA e caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	49
4.1.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA.....	49
4.1.2. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA.....	50
4.2. Avaliação da solubilidade dos derivados 3-fenilcumarínicos em meio aquoso	52
4.3. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 3-fenilcumarínicos.....	53
4.4. Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por imunocomplexos	54
4.5. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima NADPH oxidase	58
4.6. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima mieloperoxidase.....	59
4.7. Avaliação da atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos.....	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	86

1. Introdução

1.1. Características e funções gerais dos neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea em humanos, representando de 40 a 60% da população celular (LUERMAN et al., 2010; KUMAR; SHARMA, 2010). Eles têm um papel fundamental na resposta imune inata principalmente contra patógenos extracelulares, como pode ser visto em indivíduos neutropênicos ou com doença granulomatosa crônica, que são suscetíveis a infecções fúngicas (PARKER et al., 2011).

Essas células são originárias da linhagem mielóide, sendo classificadas como polimorfonucleares, assim como os eosinófilos e basófilos, por possuírem núcleo segmentado. Sua maturação, que acontece na medula óssea, é um processo que requer fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), e envolve vários estágios de desenvolvimento que incluem pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos, até a completa maturação com a formação dos grânulos e a segmentação do núcleo (KUIJPERS, 2002; CASCÃO et al., 2009; BOUMA et al., 2010). Os neutrófilos foram descobertos quando as técnicas laboratoriais possibilitaram a marcação dos seus grânulos como também do núcleo segmentado (DALE et al., 2008; AMULIC et al., 2012) (Figura 1.1).

Figura 1.1. Neutrófilo e suas características morfológicas: núcleo segmentado e grânulos citoplasmáticos. Fonte: Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP.

O recrutamento dos neutrófilos para o sítio inflamatório é muito rápido, caracterizando-os como as primeiras células a migrarem para o local da inflamação (SUMMERS et al., 2010). Em repouso na circulação, estas células têm um tempo de vida relativamente curto, sobrevivendo de 8-12h (WONG et al., 2009). Entretanto, elas podem ser pré-ativadas na própria circulação por fatores como citocinas, quimiocinas ou produtos bacterianos, chegando ao local da inflamação mais hábeis para eliminar os agentes infecciosos, uma vez que, neste processo, ocorre o aumento da expressão de receptores de membrana, que são mobilizados dos grânulos intracelulares para a superfície da célula

(CROSS et al., 2005). Por outro lado, em um processo mais tardio, o “priming” pode levar à ativação de fatores de transcrição que promovem o retardo do processo apoptótico, aumentando a sobrevivência dos neutrófilos, e também favorecer a secreção de citocinas que modulam a resposta imune (RAZA et al., 2006; WRIGHT et al., 2010). Além do mais, o aumento da sobrevivência dos neutrófilos favorece o desencadeamento das suas funções clássicas na eliminação dos antígenos, mas, em contrapartida, pode aumentar o dano tecidual.

Os neutrófilos são classicamente caracterizados pelas suas capacidades de fagocitose, liberação de enzimas líticas e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Associado a essas funções, que são de extrema importância para a defesa do hospedeiro, sabe-se atualmente que os neutrófilos podem desempenhar outros papéis dentro do contexto da defesa do organismo, dependendo da natureza do foco inflamatório. Foi descrito recentemente que essas células podem expressar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II, tendo a capacidade de apresentar antígenos para células do padrão T_H2 (ABDALLAH et al., 2011), e também sintetizar substâncias que modulam o processo inflamatório (MANTOVANI et al., 2011).

1.2. Grânulos: produção e liberação

Durante o processo de diferenciação dos leucócitos da linhagem mielóide na medula óssea, os granulócitos, grupo de células hematopoiéticas no qual os neutrófilos estão inseridos, desenvolvem grânulos citoplasmáticos por um processo denominado granulopoiese (BORREGAARD, 2010). Nos neutrófilos, os grânulos são classificados em primários ou azurofílicos, secundários ou específicos, terciários ou ricos em gelatinase, além das vesículas secretórias (SOEHNLEIN et al., 2009). A mobilização desses grânulos e vesículas durante a migração das células até o foco inflamatório acontece de forma sequencial. As vesículas secretórias são as primeiras a serem mobilizadas, sendo seguidas pelos grânulos terciários, secundários e primários, nesta ordem.

As vesículas secretórias são constituídas basicamente de receptores de membrana (Tabela 1.1), capacitando a célula para reconhecer os patógenos e favorecendo a interação do neutrófilo com o endotélio (CASCÃO et al., 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 (ERO) (PAULSSON et al., 2010).

Tabela 1.1. Principais componentes dos grânulos dos neutrófilos ^(a)

Grânulos primários	Grânulos secundários	Grânulos terciários	Vesículas secretórias
mieloperoxidase	lisozima	receptor para fMLP	receptor para fMLP
defensinas	lactoferrina	Mac-1(CD11b/CD18)	LFA-1(CD11a/CD18)
catepsina G	receptor para fMLP	receptor para laminina	Mac-1(CD11b/CD18)
elastase	Mac-1(CD11b/CD18)	citocromo b ₅₅₈	CR1
proteinase 3	receptor para laminina	β2-microglobulina	citocromo b ₅₅₈
azurocidina	citocromo b ₅₅₈	gelatinase	DAF
lisozima	gelatinase	diamina oxidase	leucolisina
fosfatase alcalina	colagenase	H ⁺ ATPase	fosfatase alcalina
hidrolases	histaminase	tetranectina	
fosfolipase A2	heparinase	DAG lipase	
fosfolipase C	sialidase	lisozima	
fosfolipase D		acetiltransferase	

(a) Fontes: HAGER et al., 2010; WRIGHT et al., 2010.

A interação dos neutrófilos com o endotélio é de extrema importância para a migração dos mesmos até o foco inflamatório. Esse processo inicia-se com o reconhecimento de selectinas presentes no endotélio dos locais da inflamação (selectinas E, P e PSGL-1) por moléculas presentes na membrana dos neutrófilos (selectina L). Para o êxito no processo migratório, as etapas subsequentes utilizam-se de componentes das vesículas secretórias, que incluem as integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), que são mobilizadas para a membrana. Elas ligam-se a moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 e 2) que são expressas no endotélio. A mobilização dos grânulos favorece a continuidade do processo migratório (HAGER et al., 2010).

Os grânulos terciários são os que possuem um maior número de metaloproteinases, como as gelatinases, enzimas capazes de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina e proteoglicano, 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 e a mieloperoxidase

(MPO), importantes para o processo de destruição dos patógenos fagocitados, sendo a MPO uma enzima importante na produção de ERO (VAN DER VEEN et al., 2009; SIMARD et al., 2010) (Tabela 1.1).

Dessa forma, o processo de mobilização e exocitose dos grânulos, bem como a sua fusão com o fagossoma, favorecem o desencadeamento das principais funções efetoras dos neutrófilos na defesa do organismo, pois, além de aumentar o número de receptores de membrana, acentuando a fagocitose, propicia a ativação inicial dos neutrófilos e aumenta a expressão de componentes da NADPH oxidase na membrana, permitindo a produção de ERO (URIARTE et al., 2011). Além disso, o processo de desgranulação é extremamente importante para as etapas de adesão ao endotélio, diapedese e migração dos neutrófilos até o local da inflamação (AMULIC et al., 2012).

1.3. Fagocitose

A fagocitose é um eficiente mecanismo do sistema imunológico para a eliminação de patógenos e células apoptóticas (NUNES; DEMAUREX, 2010). Os neutrófilos, juntamente com os macrófagos e células dendríticas, formam um grupo de células denominado de fagócitos profissionais (SOEHNLEIN et al., 2010).

Nos neutrófilos, o processo de fagocitose ocorre em concomitância com a produção de ERO e a liberação dos produtos dos grânulos, ambos convergindo para a eliminação das partículas fagocitadas (STEEVELS; MEYAARD, 2011). Juntamente com a adesão ao endotélio e o processo de diapedese, os neutrófilos preparam-se para realizar a fagocitose, organizando em sua membrana os receptores 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) (CASCÃO et al., 2010).

As imunoglobulinas da classe G (IgG) podem interagir com microrganismos ou partículas solúveis, formando agregados, denominados de imunocomplexos ou complexos imunes, que se ligam aos receptores Fc gama (Fc γ R), ativando-os (NIMMERJAHN; RAVETCH, 2008). Esses agregados contendo imunoglobulinas promovem ainda a ativação do sistema complemento, produzindo componentes solúveis capazes de acentuar a opsonização, regular o balanço de expressão dos Fc γ R e induzir a liberação de fatores quimiotáticos (SCHMIDT; GESSNER, 2005).

A ativação dos Fc γ R e CR possibilita a reorganização do citoesqueleto, de modo que a membrana da célula emite pseudópodes que facilitam a ingestão de partículas opsonizadas (LUERMAN et al., 2010; FLANNAGAN et al., 2011). Nos neutrófilos e macrófagos, o fagossoma formado é fundido com vesículas lisossomais, originando o fagolisossoma, onde os microrganismos ou partículas engolfadas são rapidamente destruídos pela ação das enzimas líticas e das ERO (NUNES; DEMAUREX, 2010; COSTA et al., 2010).

1.4. Receptores de membrana

1.4.1. Receptores Fc γ

Diversas respostas imunes são ativadas pela interação entre agregados de imunoglobulinas ou imunoglobulinas monoméricas e seus receptores, incluindo citotoxicidade celular dependente de anticorpo, regulação de células B, fagocitose e inflamação (RAMSLAND et al., 2011).

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 (LI et al., 2009). A porção Fc (fragmento cristalizável) da IgG pode ser reconhecida por receptores Fc γ 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 Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) -subdividido em Fc γ RIIa e Fc γ RIIb- e Fc γ RIII (CD16) -subdividido em Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb (BRUHNS et al., 2009; Lu et al., 2011).

Os neutrófilos são as únicas células que apresentam de forma constitutiva dois desses receptores, Fc γ RIIa e Fc γ RIIIb. O Fc γ RI 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 Fc γ RI, apresenta grande afinidade para moléculas de IgG monoméricas (10^{-9} - 10^{-10} mol/L), enquanto os dois primeiros, Fc γ RIIa e Fc γ RIIIb, possuem baixa afinidade para estas moléculas (10^{-7} mol/L), sendo preferencialmente ligados a agregados de IgG (BOURNAZOS et al., 2009; NUUTILA et al., 2010).

O Fc γ RIIa 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; BOOTH, 2011). 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; 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 (WRIGHT et al., 2010; BELOSTOCKI et al., 2005).

O FcγRIIb 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 FcγRIIb, 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).

1.4.2. Receptores para componentes solúveis do sistema complemento

O sistema complemento, composto de mais de 30 componentes, compreendendo proteínas de membrana e solúveis, é um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata, com importância significativa também na imunidade adaptativa, orquestrando a defesa contra agentes infecciosos (DUNKELBERGER; SONG, 2010; RICKLIN et al., 2010; SKATTUM et al., 2011).

De uma forma geral, os fagócitos 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 CR são compostos por duas subunidades, sendo uma delas um dímero comum entre todos os CR (CD18) e a outra uma subunidade variável (CD11 a, b, c, d) (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Os neutrófilos expressam os receptores CR1 e CR3 (HUANG et al., 2011).

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). Já 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; FLANNAGAN et al., 2011).

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; DAS, 2009).

1.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção de ERO é uma das funções mais importantes dos neutrófilos na defesa do organismo. Esses compostos têm a potente capacidade de oxidar moléculas orgânicas, podendo causar modificações estruturais expressivas nessas moléculas, levar à perda de sua função e, conseqüentemente, à inviabilidade celular. As principais ERO produzidas pelos neutrófilos incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$), os radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$), e o oxigênio singlete (1O_2) (EL-BENNA et al., 2010; AHMAD et al., 2011).

Duas enzimas importantes nesse processo de geração de ERO são o complexo enzimático da NADPH oxidase e a mieloperoxidase (MPO). O entendimento de como essas enzimas funciona, como também a descoberta de possíveis agentes inibitórios para as mesmas, têm ganhado destaque nos últimos anos, já que elas estão envolvidas no estabelecimento de patologias crônicas. Dessa forma, a modulação funcional dessas enzimas é importante para reduzir os efeitos deletérios ocasionados pela resposta imune em diversos processos (HEUMÜLLER et al., 2008; VAN DER VEEN et al., 2009; DHIMAN; GARG, 2011; KIM et al., 2011).

Uma maneira de se avaliar o metabolismo oxidativo de neutrófilos consiste no uso de sondas quimioluminescentes, luminol e lucigenina, que são oxidadas pelas ERO, possibilitando a amplificação da luminescência. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é detectado pela lucigenina (QLluc), enquanto a produção total de ERO pode ser medida pelo luminol (QLlum) (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; VLADIMIROV; PROSKURNINA, 2009). O início da produção de ERO dá-se pela atuação do complexo enzimático da NADPH

oxidase na transferência de elétrons para o O_2 , reduzindo-o a $O_2^{\bullet-}$, que pode ser transformado em compostos instáveis capazes de reagir com uma variedade de biomoléculas e oxidá-las, bem como servir de substrato para eventos subsequentes na produção de ERO envolvendo enzimas como a superóxido dismutase e a MPO (LAMBERTH, 2004). A QLLum diz respeito à mensuração das ERO totais produzidas durante o metabolismo oxidativo. Dessa forma, por meio desse mecanismo de análise é possível investigar a ação de um composto antioxidante não só nas etapas iniciais de produção das ERO, onde está envolvido o complexo da NADPH oxidase, como também se pode verificar a ação do mesmo nos processos subsequentes que envolvem principalmente a MPO (LUCISANO-VALIM et al., 2002).

1.5.1. NADPH oxidase

O complexo enzimático da NADPH oxidase representa a etapa inicial na geração das ERO. Esse complexo enzimático é formado por subunidades citosólicas e de membrana, quando as células estão em repouso. Os componentes de membrana NOX2 ou 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 (PETRY et al., 2010; BORREGAARD, 2010).

Em resposta à ativação celular por fatores como IC, acetato de miristoilforbol (PMA) e diacilglicerol (DAG), 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 $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+$ (Figura 1.2). O componente gp91^{phox} é o responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o O_2 , 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 et al., 2009; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2010).

O $O_2^{\bullet-}$, produzido pela redução do O_2 catalisada pela NADPH oxidase, pode ser convertido, espontaneamente ou por ação enzimática da superóxido dismutase, em H_2O_2 . Este, por sua vez, pode reagir com íons metálicos e o próprio $O_2^{\bullet-}$, produzindo compostos como $HO^{\bullet}$, 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 et al., 2010).

Figura 1.2. Representação esquemática da localização dos componentes e ativação da NADPH oxidase. Nas células em repouso, os componentes da NADPH oxidase são distribuídos entre o citosol (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, p21rac ou RAC) e a membrana plasmática (gp91^{phox}/NOX2 e p22^{phox}). Após a ativação da célula os componentes citosólicos são fosforilados e migram até a membrana plasmática onde se associam com os componentes de membrana - gp91^{phox} e p22^{phox}. Ao mesmo tempo, p21rac troca o GDP por GTP e migra para a membrana. O Citocromo b558, que contém grupos heme ou flavina é ativado por p67^{phox}. O complexo NADPH oxidase ativado usa o NADPH citosólico para redução do oxigênio produzindo ânion superóxido. [Esquema adaptado de LAMBETH (2004)]. **Abreviaturas:** **PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinase, **PtdIns:** fosfatidilinositol, **PtdIns2:** fosfatidilinositol bi-fosfato, **PtdIns3:** fosfatidilinositol tri-fosfato.

1.5.2. Mieloperoxidase

Encontrada principalmente em neutrófilos, a MPO faz parte da família das hemeperoxidases dos mamíferos e é uma das proteínas mais abundantes dos neutrófilos. A MPO também pode ser encontrada em monócitos, em pequena quantidade, e uma enzima análoga ocorre em eosinófilos, denominada peroxidase de eosinófilos (PROKOPOWICZ et al., 2011).

A MPO é capaz de converter o H₂O₂, na presença de haletos como Cl⁻, Br⁻ e I⁻, em moléculas com um poder oxidante acentuado como ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipoiodoso (HOI), respectivamente. Entretanto, ocorre a

formação preferencial de HOCl, devido à elevada concentração de Cl^- nos fluidos biológicos (VAN DER VEEN et al., 2009).

O grupo heme da MPO, quando está na forma nativa, 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 et al., 2009; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010; METZLER et al., 2011).

O composto I também está envolvido com o ciclo peroxidativo, no qual 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., 2011).

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 (VALKO et al., 2007; FILIPPIN et al., 2008) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Representação simplificada das reações que ocorrem durante o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. (1): O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido pelo complexo enzimático da NADPH oxidase. (2): A dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD produz o H_2O_2 . (3): A MPO proveniente dos grânulos citoplasmáticos catalisa a produção de HOCl e outras espécies halogenadas a partir do H_2O_2 . (4): As EROs produzidas pelas etapas 1, 2 e 3 são convertidas a outras espécies oxidantes, por meio de diversas reações químicas. (5): As espécies oxidantes e os constituintes dos grânulos que extravasam para o citosol e/ou para o meio extracelular são inativadas pelos componentes do sistema de defesa celular e tecidual (alguns deles estão representados em verde). Fonte: KABEYA, (2006) [adaptado de KLEIN (1990), WEISS (1989) e HALLIWELL (1999)]. **Abreviaturas:** CAT: catalase; GPO: glutaciona peroxidase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada; MPO: mieloperoxidase; SLPI: inibidor de protease secretória de leucócitos; SOD: superóxido dismutase.

1.6. Neutrófilos e doenças causadas por deposição de imunocomplexos

As características morfológicas e funções efetoras dos neutrófilos mostram que eles apresentam mecanismos potentes para atuar na defesa do organismo, colocando-os no papel de mediadores importantes de reações inflamatórias agudas (CASCÃO et al., 2009; SOEHNLEIN et al., 2009). Estudos têm mostrado que os neutrófilos também têm um papel expressivo em processos inflamatórios crônicos (MANTOVANI et al., 2011; SEGEL et al., 2011). A ativação inapropriada e prolongada dessas células por fatores como citocinas, derivados bacterianos e imunocomplexos (IC) pode ocasionar danos teciduais associados a inúmeras doenças, como sepse, nefrite, doenças autoimunes, neurodegenerativas e cardiovasculares, além de lesão pulmonar e complicações diabéticas (LUERMAN et al., 2010; SEGEL et al., 2011).

Os IC podem ser formados em todos os processos onde ocorre a produção de anticorpos. No entanto, eles são eliminados da circulação pela incorporação de componentes do complemento e o CR1 nos eritrócitos, sendo transportados para o baço e o fígado, onde são fagocitados pelos macrófagos residentes (NIEDERER et al., 2009). Contudo, esses IC podem depositar-se nos tecidos dependendo, principalmente, das características moleculares, das cargas elétricas e do tamanho do imunocomplexo formado (MAYADAS et al., 2009).

A deposição de IC nos tecidos está fortemente relacionada com patologias, onde os neutrófilos têm participação, como a resposta inicial na rejeição de órgãos transplantados e as doenças autoimunes, dentre elas artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e febre reumática (TSUBOI et al., 2008). Este processo de deposição tecidual de IC promove o recrutamento e a ativação inapropriada dos neutrófilos, uma vez que essas células possuem receptores para IgG e componentes solúveis do sistema complemento, causando dano tecidual pela liberação das enzimas líticas e a produção de EROs (BERTOLOTTO et al., 2009; RAMSLAND et al., 2011).

Um exemplo de doença autoimune, onde a patologia está envolvida com a deposição de IC associada aos componentes do sistema complemento, é a artrite reumatóide, que atinge as regiões articulares do corpo. A deposição de IC na sinóvia inflamada favorece o recrutamento e a ativação dos neutrófilos, sendo um fator importante para a destruição da cartilagem e a formação do “pannus” (AFONSO et al., 2007; WRIGHT et al., 2010).

Portanto, as doenças inflamatórias e autoimunes mediadas por IC envolvem a participação de neutrófilos e sua interação com IC e o sistema complemento, que ocorre

via receptores Fc γ e CR presentes na membrana desses leucócitos. Assim, a modulação das funções efetoras dos neutrófilos torna-se um alvo terapêutico potencial para essas doenças (RAHMAN et al., 2006).

1.7. Cumarinas

Desde a descoberta da morfina há cerca de 200 anos, a biodiversidade do Reino *Plantae* têm fascinado estudiosos em todo o mundo, possibilitando o descobrimento de novos compostos químicos e o aprimoramento das técnicas de isolamento e identificação dos mesmos. Como reflexo desse processo, os metabólitos secundários desses organismos ou derivados de produtos naturais têm ganhado grande aplicabilidade no desenvolvimento de novos produtos de uso biológico e farmacêutico (HARVEY, 2008; LI; VEDERAS, 2009; CARTER, 2011).

Os compostos fenólicos representam um desses grupos de substâncias que têm merecido destaque nos últimos anos, principalmente pelo estudo de suas propriedades antioxidante. As cumarinas são uma família desses compostos, encontrados principalmente em plantas, seja no estado livre ou conjugado com açúcares. São substâncias heterocíclicas formadas por um anel benzeno fundido com um anel α -pirona, que apresentam uma grande variedade estrutural, servindo como protótipo para a síntese de novos produtos farmacêuticos com aplicação terapêutica em diversas áreas (KONTOGIORGIS et al., 2007; BELLUTI et al., 2010; ROUSSAKI et al., 2010; MATOS et al., 2011).

Essas substâncias, dependendo das substituições que são feitas na sua estrutura básica, apresentam propriedades biológicas e farmacêuticas diversas como, antioxidante (KONTOGIORGIS et al., 2006; THUONG et al., 2009; KHOABI et al., 2011), anti-inflamatória (KONTOGIORGIS et al., 2006; BISSONNETTE et al., 2009), antiviral (NEYTS et al., 2009), antitumoral (BELLUTI et al., 2010), vasodilatadora (VILAR et al., 2006), antimicrobiana (EL-SEEDI, 2007), “scavenger” de radicais livres (KHOABI et al., 2011) e inibidora de atividade enzimática (GRIMM et al., 2006). Tem sido relatado também que derivados cumarínicos inibem a produção de óxido nítrico, IL-12, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos de ratos estimulados por lipopolissacarídeos, sendo esse efeito biológico realizado pela supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B (CORSINI et al., 2001; KIM et al., 2004; RAGHAV et al., 2007).

Desde a década de 1990, tem-se notado um interesse crescente na busca de novos fármacos anti-inflamatórios a partir da modificação química do esqueleto cumarínico,

associada a estudos sistemáticos de relação estrutura-atividade qualitativa ou quantitativa (GHATE; KUSANUR, 2005; KHAN et al., 2005; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005). Diversos relatos da literatura, empregando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, ressaltam a importância dos grupos substituintes hidroxílicos livres ou acetilados para a atividade anti-inflamatória, bem como para a modulação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória (HOULT; PAYÁ, 1996; GARCÍA-ARGÁEZ et al., 2000; KABEYA et al., 2002).

1.7.1. Derivados 3-fenilcumarínicos

Os derivados 3-fenilcumarínicos constituem uma classe de metabólitos secundários 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).

Esses compostos possuem ampla atividade biológica, como antidepressivo (SASHIDHARA et al., 2011), anticoagulante (TUNALI et al., 2011), antioxidante (ROUSSAKI et al., 2010), inibidora da enzima lipoxigenase (ROUSSAKI et al., 2010), inibidora da enzima monoamina oxidase B (MATOS et al., 2011), inibidora da agregação plaquetária (TAWATA et al., 1990) e antibacteriana (NKENGFAK et al., 2000).

No estudo de MARCHI e colaboradores (2004), foi observada uma atividade inibitória dos derivados 3-fenilcumarínicos frente à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Como esta enzima tem um papel essencial na via

glicolítica do parasita, a sua inibição pelos derivados 3-fenilcumarínicos indica uma possível atividade tripanocida destes compostos.

KABEYA e colaboradores (2007) avaliaram o efeito antioxidante de uma série de derivados 3-fenilcumarínicos frente à enzima *horseadish* peroxidase (HRP). Derivados com grupos catecólicos na estrutura tiveram destaque na inibição enzimática. Em outro trabalho, também realizado por KABEYA e colaboradores (2008), 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.

ROUSSAKI e colaboradores (2010) observaram a atividade “scavenger” de HOCl por derivados 3-fenilcumarínicos, como também a capacidade de peroxidação lipídica, sendo o grupo catecol identificado como o substituinte importante para essas atividades. Além disso, foi observado que essas substâncias apresentam atividade anti-inflamatória por inibir a enzima lipoxigenase.

De modo geral, os relatos da literatura acerca das atividades biológicas de 3-fenilcumarinas são escassos e relativamente recentes, o que reforça a necessidade de estudos adicionais para ampliar o conhecimento sobre os efeitos biológicos desta classe de substâncias, bem como para o entendimento dos seus possíveis mecanismos de ação, tendo em vista uma possível aplicação terapêutica.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante de dez derivados 3-fenilcumarínicos com estruturas químicas semelhantes, no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores FcγR, por meio de imunocomplexos formados por IgG e ovalbumina (OVA).

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

- Obtenção, purificação e caracterização da IgG anti-OVA;
- Avaliação da citotoxicidade dos derivados 3-fenilcumarínicos, por meio da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase e da análise da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do corante azul de Tripán;
- Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores FcγR, por meio dos ensaios de quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina;
- Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos selecionados na atividade da enzima NADPH oxidase, através da medida do consumo de O₂ por neutrófilos estimulados via receptores FcγR;
- Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos selecionados na atividade da enzima mieloperoxidase, utilizando-se ensaio livre de células;
- Avaliação da atividade “scavenger” de HOCl de derivados 3-fenilcumarínicos selecionados, através de ensaio livre de célula.

3. Casuística e Métodos

3.1. Sujeitos da Pesquisa

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado sangue periférico humano, para obtenção de neutrófilos, proveniente de voluntários saudáveis que foram conscientizados dos 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 (Protocolo de pesquisa CEP/FCFRP nº 182, anexo 1).

3.2. Colheita de sangue e purificação de neutrófilos humanos

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi colhido por punção venosa, com sistema a vácuo, e transferido para tubos tipo *falcon* com anticoagulante Alséver pH 6,1 (v/v). Para a purificação dos neutrófilos seguiu-se o método de HENSON (1971), modificado por LUCISANO e MANTOVANI (1984), conforme descrito a seguir.

O sangue foi centrifugado a 1250g por 10 minutos a 25°C (Centrífuga Eppendorf 5810 R, Hamburg, Alemanha) e a camada superior de células foi removida com o plasma. As células sedimentadas foram suspensas em solução de gelatina a 2,5% em NaCl 0,15 mol/L, e depois incubadas por 30 minutos a 37°C. Na sequência, o sobrenadante foi coletado, diluído em NaCl 0,15 mol/L e centrifugado (974g, 10 minutos, 25°C). Para lisar as hemácias, o sedimento foi suspenso em NH₄Cl 0,83%, pH 7,2 e incubado a 37°C por 5 minutos. Logo depois, foi realizada uma centrifugação (974g, 10 minutos, 25°C), as células foram suspensas em NaCl 0,15 mol/L e centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores. Os neutrófilos purificados foram suspensos em Hanks pH 7,2 com 0,1% de gelatina, nas concentrações requeridas para cada experimento, e mantidos em banho de gelo até o momento do uso.

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 90% e a viabilidade, de 98%.

3.3. Obtenção, purificação e caracterização dos anticorpos

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

Para a obtenção dos anticorpos foram utilizados coelhos 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 n° 05.1.1050.53.9, anexo 2).

Os coelhos foram imunizados com solução de antígeno (albumina de ovo de galinha – OVA, Sigma, St. Louis, Estados Unidos da América) preparada a 5 mg/mL em NaCl a 0,15 mol/L, e emulsionada em adjuvante completo de Freud (1:2). A emulsão foi administrada por via subcutânea no dorso do animal, sendo que cada animal recebeu quatro injeções de 0,5 mL, totalizando 5 mg de OVA por animal. Após 30 dias, os mesmos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e ketamina (35 mg/kg) para colheita do sangue por punção cardíaca, sendo os animais eutanasiados em câmara de CO₂ imediatamente após o término do procedimento.

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

3.3.2. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA

Para purificação das imunoglobulinas foi utilizada a metodologia descrita por FAHEY et al. (1964), modificada por LUCISANO e MANTOVANI (1984). As proteínas globulinas do soro foram precipitadas pela adição de (NH₄)₂SO₄ saturado, em quantidade suficiente para atingir 40% de saturação. A mistura ficou em repouso por 24 horas a 4°C, e depois foi centrifugada (1800g, 15 minutos, 25°C). O precipitado foi lavado com solução de (NH₄)₂SO₄ a 40% (m/v), centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores, dissolvido em PBS pH 7,4 e dialisado contra solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) a 4°C por 24 h.

Após essa etapa, empregou-se a técnica de cromatografia de troca iônica para purificar a IgG contida na amostra dialisada. Para isso, foi utilizada a resina dietilaminoetil (DEAE)-celulose como fase estacionária e solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) como fase móvel. O efluente da coluna foi recolhido e as proteínas foram detectadas por meio da leitura da absorvância em 280 nm, em espectrofotômetro (modelo U2910, Hitachi Instruments, Tóquio, Japão). Quando o pico I, que contém a IgG total, foi eluído, adicionou-se solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) suplementada com 1 mol/L de NaCl para eluir as demais proteínas presentes na amostra. As frações correspondentes ao

primeiro grupo de proteínas eluídas foram reunidas e concentradas por filtração em membrana de celulose com limite de exclusão de 100 kDa. Por último, as amostras foram fracionadas em tubos tipo *ependorf* e armazenadas a -20°C até o uso.

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

Para analisar se a preparação de IgG estava pura, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970). Para isso, um gel de empilhamento a 4% e um gel de corrida a 10%, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 mol/l pH 6,8 e Tris-HCl 1,5 mol/l pH 8,8, respectivamente, foi montado no suporte de eletroforese. Além dos géis, solução de acrilamida a 30% (m/v) e o catalisador tetrametilenodiamino (TEMED) a 10% (m/v), foram utilizados.

As amostras de IgG e os padrões de proteína de alta densidade foram diluídos (na proporção 1:10 e 1:2, respectivamente), em uma mistura constituída de tampão Tris 0,06 mol/L pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol. A análise eletroforética foi realizada em temperatura ambiente (25°C) sob corrente elétrica contínua de 10 mA, utilizando-se o tampão Tris-glicina pH 8,3 como fase móvel. O tempo de análise foi determinado acompanhando-se a migração do corante azul de bromofenol.

Para calcular a massa molecular das amostras de IgG, foi construída uma curva de logaritmo da massa molecular (log M.M.) em função do fator de retardamento (R_F) de cada proteína do padrão de massa molecular.

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

No intuito de avaliar a habilidade da IgG em reagir com o antígeno, bem como as quantidades relativas de IgG e OVA necessárias para formação de imunocomplexo, foi realizada uma imunodifusão radial dupla de acordo com o método de OUCHTERLONY (1958). Para isso, uma camada de Agar fundido (preparado a 1,3% em PBS pH 7,4) sobre uma lâmina de vidro foi depositada e, após solidificação, poços nos quais foram adicionadas amostras de OVA (1 mg/ml) e de IgG, diluídas de forma seriada foram perfurados. Após 48 h em temperatura ambiente (25°C), o gel foi lavado, seco em estufa a 37°C e corado com Coomassie Brilliant Blue “G”. Após lavagem com solução descolorante (metanol: ácido acético: água 10:15:75), foi possível analisar, de modo qualitativo, a zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo em questão.

A análise desta lâmina mostrou a provável proporção de antígeno e anticorpo do ponto de equivalência. A partir daí, foi construída a curva de precipitação para

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

As suspensões formadas foram centrifugadas (7200g, 15 minutos, 25°C), lavadas por duas vezes e suspensas em NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi dissolvida em NaOH 0,1 mol/L e diluída em NaCl 0,15 mol/L, para leitura de absorvância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm.

3.4. Síntese dos derivados 3-fenilcumarínicos utilizados no estudo

Os derivados 3-fenilcumarínicos (Figura 3.1) foram sintetizados com a colaboração dos grupos de pesquisa da Profa. Dra. Monica 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).

As substâncias foram sintetizadas através da reação de Perkin-Ogliastro, onde derivados do ácido fenilacético (Aldrich) reagem com derivados do salicilaldeído (Aldrich), ambos apropriadamente substituídos, em meio contendo anidrido acético e acetato de potássio (MARCHI et al., 2004; KABEYA et al., 2007; MATOS et al., 2011). Os derivados 3-fenilcumarínicos foram purificados por recristalização, avaliados quanto à pureza por cromatografia em camada delgada e caracterizados pela determinação do ponto de fusão. Todas as amostras mostraram um grau de pureza adequado (97-99%) para serem utilizadas nos ensaios subsequentes. As estruturas químicas foram elucidadas por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, bem como por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*.

3.5. Avaliação da solubilidade dos derivados 3-fenilcumarínicos em meio aquoso

Os derivados 3-fenilcumarínicos foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) e avaliados com relação à solubilidade em meio aquoso (Hanks pH 7,4). As substâncias foram classificadas como insolúveis quando precipitaram no meio da reação em temperatura ambiente (25°C) ou em solúveis quando a solução permaneceu límpida. Foi estabelecida a concentração máxima de 20 µmol/L em meio aquoso para a realização dos ensaios biológicos.

Figura 3.1. Nomenclatura e estrutura química dos derivados 3-fenilcumarínicos utilizados no estudo. Os códigos ao lado de cada nome das estruturas foram estabelecidos durante o processo de síntese.

3.6. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 3-fenilcumarínicos

A fim de verificar se os derivados 3-fenilcumarínicos apresentam citotoxicidade, foi realizado o teste de viabilidade celular, conforme descrito em LUCISANO-VALIM et al. (2002). Três experimentos independentes foram realizados, com medidas em duplicata.

Os neutrófilos (2×10^6 mL), purificados a partir de sangue periférico humano (item 3.2), foram incubados com os derivados 3-fenilcumarínicos na maior concentração em estudo (20 μ mol/L), Triton X-100 (0,2%; v/v), solvente (DMSO; 0,1%; v/v) ou Hanks, por um período de 30 minutos 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 Hanks com gelatina 0,1% 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.

3.7. Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados via receptores Fc gama

O metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por IC IgG-OVA foi avaliado através da medida da produção de $O_2^{\bullet-}$ por meio da quimioluminescência (QL) dependente de lucigenina (QLluc), e da produção total de ERO por QL dependente de luminol (QLlum), conforme metodologia adaptada de LUCISANO-VALIM et al. (2002).

Em placas de 96 poços, foram adicionados os neutrófilos (2×10^6 mL), os derivados 3-fenilcumarínicos ou solvente (DMSO; 0,15%), e as sondas quimioluminescentes luminol (100 μ mol/L) ou lucigenina (100 μ mol/L). Após incubação por 3 minutos a 37°C, foi adicionado IC IgG-OVA (60 μ g/mL) a cada poço para estimular as células e, imediatamente, foi medida a QL durante 20 minutos a 37°C em luminômetro de microplacas (modelo LB 960 Centro, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha). 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. O esquema representativo dessas etapas encontra-se na Figura 3.2.

Figura 3.2. Representação das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade das 3-fenilcumarinas 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 IC₅₀ de cada substância avaliada, por meio de regressão não-linear. [Adaptado de KABEYA (2006)].

No intuito de realizar uma triagem do efeito antioxidante das amostras em estudo, foi estabelecida uma concentração para avaliar todas as substâncias e selecionar aquelas cujo efeito na inibição da QL fosse igual ou superior a 50%. Aquelas substâncias que apresentaram essa propriedade foram avaliadas em diferentes concentrações para calcular o IC₅₀, isto é, a quantidade de amostra necessária para inibir 50% da QL (QLlum ou QLluc).

Para ambos os casos (triagem de efeito e cálculo de IC₅₀) no mínimo três experimentos independentes, com medidas em duplicata foram realizados.

3.8. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima NADPH oxidase

O efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre o complexo enzimático da NADPH-oxidase foi avaliado por meio da mensuração do consumo de O₂ por neutrófilos humanos estimulados com IC IgG-OVA, utilizando-se eletrodo de Clark acoplado a oxígrafo (Gilson Medical Electronics, Middleton, Estados Unidos da América).

Neste ensaio, foram avaliadas apenas as substâncias mais ativas em inibir a QLuc. As células (4x10⁶mL) foram incubadas com os derivados 3-fenilcumarínicos (20 µmol/L) ou DMSO (0,1%) por 3 minutos a 37°C para medida da taxa basal de consumo de O₂. O estímulo (IC, 240 µg/mL) foi adicionado e o consumo de O₂ foi monitorado por 7 minutos a 37°C. A porcentagem de inibição foi calculada com relação ao valor máximo de consumo de O₂ pelos neutrófilos incubados com DMSO (0,1%). O cloreto de difenilenoidônio (DPI, 1 µmol/L), que é um inibidor padrão da enzima NADPH oxidase, foi utilizado para verificar a funcionalidade do método. Além disso, foi utilizado o flavonóide quercetina (5 µmol/L) como padrão de comparação, visto que essa substância possui ampla ação antioxidante (HAPNER et al., 2010). Três experimentos independentes, com medidas em duplicata foram realizados.

3.9. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima mieloperoxidase

O efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre a atividade da MPO foi avaliado em sistema livre de célula, de acordo com método descrito por REGASINI et al. (2008), com modificações. Neste ensaio, foram avaliadas apenas as substâncias mais ativas em inibir a QLuc.

Para a realização deste ensaio, os reagentes e amostras foram diluídos em tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,4. Em microplacas de 96 poços, os derivados 3-fenilcumarínicos (20 µmol/L) em estudo ou o solvente (DMSO; 0,1%) foram incubados com a MPO (0,3 µg/mL) e guaiacol (30 mmol/L) por 2 minutos em temperatura ambiente (25°C). A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ (500 µmol/L), e a oxidação do guaiacol foi mensurada em 470 nm, por um período de 2 minutos em temperatura ambiente (25°C), utilizando-se espectrofotômetro (Varian Cary 50 Bio UV/Visible Spectrophotometer, Sparta, Austrália).

Os derivados 3-fenilcumarínicos que apresentaram um efeito inibitório igual ou maior que 50% foram avaliados em diferentes concentrações para posterior cálculo do valor de IC₅₀. Como controle do experimento, foi utilizado um inibidor padrão da atividade da MPO, a *p*-aminobenzohidrazida (*p*-AB). Foram realizados três experimentos independentes, com medidas em duplicata.

3.10. Avaliação da atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos

A atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos com maior efeito inibitório sobre a QLLum foi avaliada em microplacas de 96 poços, por meio de um sistema livre de células, conforme metodologia de DYPBUKT et al. (2005), com modificações. Foi utilizado hipoclorito de sódio comercial como fonte de HOCl. Para a realização deste ensaio, o hipoclorito e as amostras foram diluídos em tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4, contendo 140 mmol/L de NaCl e 10 mmol/L de KCl, e as etapas de incubação e reação foram realizadas em temperatura ambiente (25°C).

As 3-fenilcumarinas ou o solvente (dimetilformamida; 0,03%) foram incubados com HOCl⁻ (50 µmol/L por 10 minutos). Em seguida, foi adicionada taurina (5 mmol/L) e, após 5 minutos, foi adicionado o revelador. Após 5 minutos de reação, a absorvância final foi medida em 630 nm em leitor de microplacas de 96 poços (EIA Multi-well Reader II, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, Estados Unidos da América). Como revelador da reação, foi utilizado 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 0,4 mmol/L preparado em dimetilformamida e diluído em tampão acetato 0,4 mol/L pH 5,4, contendo 0,02 mmol/L de KI.

Inicialmente, foi realizada uma triagem de efeito das amostras em uma única concentração. As substâncias cujo efeito “scavenger” de HOCl fosse igual ou superior a 50% foram avaliadas em diferentes concentrações para calcular o IC₅₀. No mínimo três experimentos independentes, com medidas em duplicata foram realizados.

3.11. Análise de dados

Os dados obtidos foram processados e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 3.00. 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 $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA e caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti-OVA

4.1.1. Purificação do soro imune rico em IgG anti-OVA

Os anticorpos foram obtidos por meio da imunização de coelhos com OVA. A purificação das frações globulinas do soro desses animais foi realizada em várias etapas, conforme descrito no item 3.3.1.

O perfil cromatográfico do soro imune é mostrado na Figura 4.1, onde foram detectados, por meio da leitura de absorvância em 280 nm, dois grupos distintos de proteínas eluídas: o primeiro grupo corresponde às frações de interesse (IgG) e o segundo grupo corresponde às demais proteínas séricas presentes na amostra analisada. As frações cromatográficas de interesse foram reunidas, concentradas e caracterizadas por meio das técnicas de eletroforese e imunodifusão radial dupla, cujos resultados são apresentados abaixo.

Figura 4.1. Perfil cromatográfico de soro imune rico em IgG anti-OVA, obtido em coluna de DEAE-celulose. Utilizou-se como fase móvel solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) para eluição do grupo 1 (IgG total), e tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) acrescido de 1 mol/L de NaCl para eluição do grupo 2 (demais proteínas séricas contidas na amostra). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, e o volume de cada fração cromatográfica foi de 5 mL, coletada em temperatura ambiente. **Abreviaturas:** DEAE: dietilaminoetil; IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovoalbumina.

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

Na Figura 4.2, pode ser analisada a significativa homogeneidade na preparação da IgG, visto que por meio da técnica de eletroforese foi encontrada uma banda única e fina no gel, mostrando que as técnicas de purificação empregadas foram efetivas para a obtenção de uma preparação de IgG policlonal com elevado grau de pureza. Os valores de logaritmo da massa molecular das proteínas constituintes do padrão de massa molecular foram plotados em função do seu fator de retardamento. Após análise dos dados por meio de regressão linear foi obtida a equação da reta, a qual possibilitou o cálculo da massa molecular aparente da IgG purificada, que foi de 155 kDa (Figura 4.3).

Figura 4.2. Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA. Os valores de massa molecular das soluções padrões estão indicados na figura. **Abreviatura: IgG:** Imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina.

A habilidade da IgG de reagir com o antígeno (OVA) foi avaliada por meio de imunodifusão radial dupla (Figura 4.4). Por meio da análise da figura percebe-se que a proporção antígeno-anticorpo da zona de equivalência é anticorpo 1:2 e antígeno 1:2. Essa proporção foi confirmada através da determinação quantitativa de imunocomplexos precipitados, utilizando-se anticorpo na diluição 1:2 e OVA em diferentes diluições (Figura 4.5). Pode ser visto que o maior valor de absorvância e, portanto, a maior concentração de IC precipitados, foi obtido utilizando-se 0,5 mg/mL de OVA, equivalente ao antígeno na diluição 1:2.

Figura 4.3. Curva de logaritmo da massa molecular (log MM) em função do fator de retardamento (R_F) das proteínas separadas por eletroforese. Por meio da equação da reta de regressão linear foi possível determinar a MM aparente da IgG (155 kDa; círculo indicado pela seta), purificada por cromatografia de troca iônica. **Abreviatura:** IgG: Imunoglobulina da classe G.

Figura 4.4. Imunodifusão radial dupla para avaliação da presença de IgG anti-OVA na preparação de IgG total, obtida após purificação de soro de coelhos imunizados com OVA. Foi utilizada uma lâmina de vidro recoberta com agar a 1,3% (m/v) em PBS. Foram colocados nos poços amostras de IgG total purificada e de OVA (1 mg/mL), diluídas em diferentes proporções. **Abreviaturas:** IgG: Imunoglobulina da classe G; OVA: Ovalbumina; S/d: Não diluído.

Figura 4.5. Curva de precipitação de imunocomplexos formados de IgG anti-OVA (diluído 1:2) e OVA em diferentes diluições. A análise foi feita por meio da determinação da concentração de proteínas pela medida de absorvância em 280 nm. A seta indica o ponto de equivalência, onde houve o máximo de precipitação dos IC. **Abreviaturas:** **IgG:** Imunoglobulina da classe G; **OVA:** Ovalbumina.

4.2. Avaliação da solubilidade dos derivados 3-fenilcumarínicos em meio aquoso

Para avaliar a solubilidade dos derivados 3-fenilcumarínicos em meio aquoso foi utilizada a solução de Hanks. As substâncias que possuem somente grupos hidroxila como substituintes foram as mais fáceis de solubilizar nas concentrações analisadas, enquanto aquelas com grupos acetoxila apresentaram uma maior resistência à solubilização. Dessa forma, a maior concentração possível de serem diluídos os derivados 3-fenilcumarínicos acetoxilados em meio aquoso é de 30 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 4.1). Assim, para podermos comparar o efeito de todas as amostras, selecionamos a condição em que seria possível avaliar as amostras acetoxiladas.

Para avaliação das funções biológicas dos derivados 3-fenilcumarínicos, através dos ensaios celulares e livres de célula, foi estabelecido o valor de 20 $\mu\text{mol/L}$ como concentração final máxima das substâncias na reação, visto que outros componentes fazem parte da reação final.

Tabela 4.1. Avaliação da solubilidade dos derivados 3- fenilcumarínicos em Hanks.

Substância	Concentração ($\mu\text{mol/L}$)		
	100	50	30
C1	i	s	s
C6	i	s	s
C6a	i	i	s
C13	i	s	s
C13a	i	i	s
C15	i	s	s
C18	i	s	s
C18a	i	s	s
C24	i	s	s
C24a	i	i	s

Classificação em insolúvel (**i**) e solúvel (**s**) baseada na formação ou não de precipitado, após 30 minutos de incubação em solução de Hanks (pH 7,4), em temperatura ambiente (25°C).

4.3. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 3-fenilcumarínicos

Para avaliar se os derivados 3-fenilcumarínicos, na maior concentração utilizada (20 $\mu\text{mol/L}$), apresentavam atividade tóxica sobre os neutrófilos humanos, foram realizados os ensaios de exclusão do corante azul de Tripán e de determinação da atividade da enzima LDH.

Cerca de 96% das células tratadas com as amostras ou solvente (DMSO) apresentaram-se viáveis no ensaio de exclusão do corante azul de Tripán, sendo estes resultados semelhantes ao controle negativo (Hanks) (Tabela 4.2). No ensaio da atividade da enzima LDH, não houve diferença na porcentagem de LDH liberada em relação ao controle (Hanks), para as células tratadas com os derivados 3-fenilcumarínicos ou solvente. Além disso, os valores da atividade da LDH nas amostras e no controle negativo foram muito menores que os obtidos para o controle positivo (0,2% de Triton X-100) (Tabela 4.2). Esses resultados demonstram que os derivados 3-fenilcumarínicos, na maior concentração em estudo, não apresentam citotoxicidade sobre os neutrófilos humanos.

Tabela 4.2: Avaliação do efeito citotóxico dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre neutrófilos humanos. ^(a)

Substância ^(b)	Células viáveis (%) ^(c)	Atividade da LDH (U/L)	LDH liberada (% do controle) ^(d)
Triton X-100	----	0,452 ± 0,090*	----
Hanks	97,5 ± 0,9	0,032 ± 0,013	5,68 ± 1,01
DMSO	96,6 ± 1,3	0,030 ± 0,008	6,67 ± 2,40
C1	96,0 ± 1,0	0,031 ± 0,015	6,52 ± 2,84
C6	95,5 ± 2,0	0,028 ± 0,019	3,45 ± 1,25
C6a	96,5 ± 1,0	0,016 ± 0,007	3,45 ± 1,50
C13	95,0 ± 2,0	0,035 ± 0,012	6,70 ± 2,57
C13a	95,3 ± 2,9	0,030 ± 0,015	5,14 ± 0,72
C15	96,7 ± 1,0	0,035 ± 0,020	6,46 ± 2,75
C18	97,9 ± 0,7	0,018 ± 0,006	3,92 ± 1,33
C18a	96,4 ± 1,3	0,014 ± 0,003	2,88 ± 0,53
C24	95,0 ± 1,8	0,044 ± 0,008	8,43 ± 0,97
C24a	95,0 ± 2,5	0,040 ± 0,019	5,93 ± 2,17

(a) Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. (b) Triton X-100 0,2% (controle positivo); Hanks (controle negativo); DMSO 0,1% (controle do solvente); derivados 3-fenilcumarínicos avaliados em 20 µmol/L. (c) Determinado pelo ensaio de exclusão ao Azul de Tripan, com base na contagem de 200 células. (d) Calculado em relação do controle positivo (100% de lise), onde as células foram lisadas com 0,2% de Triton X-100. *p<0,01 vs. Hanks (controle negativo) (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

4.4. Avaliação do efeito de derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por imunocomplexos

A atividade biológica dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos foi avaliada por meio de ensaios de quimioluminescência utilizando as sondas luminol e lucigenina. Dez substâncias, com um mesmo esqueleto carbônico, mas com diferenças em relação à presença ou não de grupos substituintes, foram analisadas. Os grupos substituintes variam com relação a tipo, posição e quantidade.

Todas as amostras apresentaram efeito inibitório na quimioluminescência. No entanto, cinco delas (**C6**, **C13**, **C13a**, **C24** e **C24a**), que possuem grupos substituintes hidroxí e acetoxí, foram capazes de inibir 50% ou mais a QLlum ou QLluc, na

concentração em análise (20 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 4.6). Esse efeito inibitório foi o critério utilizado para selecionar as substâncias utilizadas nos experimentos subsequentes.

As substâncias selecionadas foram avaliadas em diferentes concentrações no intuito de verificar se o efeito inibitório da QLlum ou QLluc é dependente de concentração, além de possibilitar o cálculo do IC_{50} , isto é, a concentração dos derivados 3-fenilcumarínicos necessária para inibir 50% da QLlum ou QLluc. Verificou-se que todos os derivados 3-fenilcumarínicos selecionados para a realização desse ensaio mostraram um efeito inibitório dependente de concentração, que pode ser visto na Figura 4.7.

As amostras **C13** e **C24**, que possuem hidroxilas vizinhas como grupos substituintes, apresentaram os menores valores de IC_{50} , sendo $1,05 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ e $0,73 \pm 0,23 \mu\text{mol/L}$ para a QLlum, respectivamente; $1,28 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ e $6,98 \pm 2,61 \mu\text{mol/L}$ para a QLluc, respectivamente. Os valores para todas as substâncias analisadas nesse ensaio podem ser vistos na Tabela 4.3.

De um modo geral, o efeito inibitório das amostras **C13**, **C13a**, **C24** e **C24a** na QLlum foi significativamente maior do que na QLluc, o que não se observou para **C6**. A porcentagem de inibição da QLlum pelos derivados de fenilcumarinas obedeceu a seguinte ordem: **C24** > **C13** > **C24a** > **C13a** > **C6**. Já para a QLluc, o padrão de inibição pelas fenilcumarinas foi: **C13** > **C24** > **C6** > **C24a**; entretanto, para a amostra **C13a** não foi possível calcular o IC_{50} , visto que seria necessária uma concentração maior que a permitida para a realização dos experimentos.

Figura 4.6: Porcentagem de inibição da QLlum (A) e da QLluc (B) de neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos, na presença 20 μmol/L dos derivados 3-fenilcumarínicos. Neutrófilos (2×10^6 mL) foram tratados (3 min, 37°C) com os derivados 3-fenilcumarínicos ou DMSO (0,1%; controle) e em seguida estimulados com imunocomplexos (60 μg/mL), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. Valores de porcentagem de inibição calculados em relação ao controle (DMSO). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

Figura 4.7: Porcentagem de inibição da QLlum (A) e da QLluc (B) de neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos, promovida por diferentes concentrações dos derivados 3-fenilcumarínicos. Neutrófilos (2×10^6 ml) foram tratados (3 min, 37°C) com os derivados 3-fenilcumarínicos ($0,01 - 20 \mu\text{mol/L}$) ou DMSO ($0,1\%$; controle), e em seguida estimulados com imunocomplexos ($60 \mu\text{g/mL}$), medindo-se a QL (15 min, 37°C) em luminômetro. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. Valores de porcentagem de inibição calculados em relação ao controle (DMSO). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

Tabela 4.3: Inibição da QLlum e da QLluc pelos derivados 3-fenilcumarínicos, representado pelo valor de IC₅₀, para neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos.

Derivados 3-fenilcumarínicos	IC ₅₀ (μmol/L) ^(a)	
	QLlum	QLluc
C6	10,44 ± 3,14 ^a	7,48 ± 2,45 ^x
C13	1,05 ± 0,16 ^{b,d}	1,28 ± 0,05 ^{y,*}
C13a	4,06 ± 0,72 ^c	> 20
C24	0,73 ± 0,23 ^b	6,98 ± 2,61 ^{x,*}
C24a	2,01 ± 0,85 ^d	8,32 ± 1,51 ^{x,*}

(a) Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** os valores com letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença significativa (p<0,05; ANOVA seguido pelo teste de Tukey). *diferença significativa entre os valores de uma mesma linha (p<0,01; teste *t* de Student não pareado). **Abreviaturas:** **QLlum:** quimioluminescência dependente de luminol; **QLluc:** quimioluminescência dependente de lucigenina.

4.5. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima NADPH oxidase

No intuito de investigar os mecanismos envolvidos na inibição da QLluc pelos derivados 3-fenilcumarínicos, foi avaliado o consumo de O₂ pelos neutrófilos humanos tratados com essas substâncias e estimulados por IC. A mensuração do consumo de O₂ foi realizada por meio de eletrodo de Clark acoplado a oxígrafo. O flavonóide quercetina foi utilizado nesse experimento como padrão, para fins de comparação, pois seu efeito inibitório na atividade da NADPH oxidase de neutrófilos humanos já é conhecido (ROMERO et al., 2009; MLADENKA et al., 2010). O DPI, que é um inibidor padrão da NADPH oxidase, foi utilizado para averiguar a funcionalidade do método, representando 100% de inibição da atividade enzimática.

De acordo com os dados apresentados na Figura 4.8, pode-se observar que todas as amostras utilizadas neste ensaio foram capazes de inibir o consumo de O₂ pelos neutrófilos estimulados com IC. A substância **C6** foi capaz de inibir aproximadamente 7% do consumo de O₂, apresentando capacidade inibitória significativamente maior que a das demais 3-fenilcumarinas avaliadas (p< 0,05), cujos efeitos foram semelhantes entre si e ficaram em torno de 5%. Além disso, o efeito inibitório das 3-fenilcumarinas foi significativamente menor que o da quercetina (p< 0,01), que inibiu em torno de 25% do

consumo de O_2 na maior concentração em estudo ($5 \mu\text{mol/L}$). Estes resultados sugerem que os derivados 3-fenilcumarínicos têm um pequeno efeito inibitório na atividade da NADPH oxidase.

Figura 4.8: Efeito inibitório dos derivados 3-fenilcumarínicos sobre o consumo de O_2 pelo sistema NADPH oxidase de neutrófilos humanos estimulados com imunocomplexos. Os neutrófilos ($4 \times 10^6 \text{ cel/mL}$) foram tratados (3 min, 37°C) com os derivados 3-fenilcumarínicos ($20 \mu\text{mol/L}$), quercetina ($5 \mu\text{mol/L}$) ou DPI ($1 \mu\text{mol/L}$) e estimulados com imunocomplexos ($240 \mu\text{g/mL}$), realizando-se a medida do consumo de O_2 em oxígrafo (7 min, 37°C). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. Valores de porcentagem de inibição calculados em relação ao controle (DMSO $0,1\%$). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey). **Abreviaturas:** DPI: cloreto de difenilenoiódio; Quer: quercetina.

4.6. Avaliação do efeito dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da enzima mieloperoxidase

No intuito de investigar os mecanismos envolvidos na inibição da QLLum pelos derivados 3-fenilcumarínicos estudados foi realizado o ensaio de inibição da enzima MPO. Esse experimento foi desenvolvido por meio de um sistema livre de célula.

As substâncias hidroxiladas inibiram a atividade da MPO, sendo este efeito dependente do número de hidroxilas na molécula: **C24** > **C13** > **C6**. A substância **C24** mostrou um efeito de aproximadamente 50% de inibição da atividade da MPO na maior concentração em estudo ($20 \mu\text{mol/L}$), que foi significativamente maior que o das demais amostras, inclusive do inibidor padrão da enzima, pAB. A amostra **C13** apresentou efeito estatisticamente semelhante ao do padrão de inibição, na maior concentração, enquanto que a **C6** teve um efeito inibitório menor que o deste inibidor (figura 4.9.A.). Além disso,

observou-se que as acetilações reduziram de modo significativo o efeito biológico, pois **C13a** e **C24a** tiveram efeitos menores que **C13** e **C24**, respectivamente.

A curva de concentração da substância **C24**, representada na figura 4.9.B, juntamente com a curva de concentração do inibidor padrão da MPO, mostrou que ambos apresentam um efeito inibitório dependente de concentração. Vale ressaltar que na maior concentração (20 $\mu\text{mol/L}$), **C24** apresentou um efeito inibitório significativo maior que o do inibidor.

Figura 4.9: Porcentagem de inibição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) promovida pelos derivados 3-fenilcumarínicos. Utilizou-se sistema livre de células, composto de MPO, H_2O_2 e guaiacol, sendo a oxidação do guaiacol medida espectrofotometricamente (470 nm, 2 min, 25°C). **(A)** Avaliação da atividade das amostras na concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$. **(B)** Curva de concentração da amostra **C24** e da *p*-aminobenzohidrazida (p-AB). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata. **Análise estatística:** letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.7. Avaliação da atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos

Os derivados 3-fenilcumarínicos com maior efeito inibitório sobre a QLum (**C6**, **C13**, **C13a**, **C24** e **C24a**), foram avaliados também quanto à atividade “scavenger” de HOCl, por meio de um ensaio livre de célula.

A Tabela 4.4 mostra os valores de IC₅₀, além da porcentagem de inibição obtida na maior concentração (12 µmol/L) das amostras avaliadas. Todos os derivados 3-fenilcumarínicos apresentaram atividade “scavenger”. Dentre elas, a amostra **C24** estatisticamente falando, teve a atividade “scavenger” mais expressiva, apresentando um IC₅₀ de 1,03 ± 0,23 µmol/L. O efeito “scavenger” da fenilcumarina **C13** foi significativamente maior que o de **C6** e **C24a**, que apresentaram efeitos semelhantes entre si. No caso da **C13a**, não foi possível calcular o IC₅₀, mas seu efeito inibitório na maior concentração avaliada foi cerca de duas vezes menor que o das demais substâncias. Portanto, o padrão de resposta observado (**C24** > **C13** > **C6** = **C24a**) sugere a importância do número de hidroxilas livres para a atividade “scavenger” de HOCl.

Tabela 4.4: Atividade scavenger de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos representada pelo valor de IC₅₀ e porcentagem de inibição na maior concentração avaliada (12 µmol/L).

	IC ₅₀ (µmol/L) ^(a)	% de inibição ^(b)
C6	5,01 ± 0,83 ^a	90,46 ± 5,09 ^b
C13	3,75 ± 0,80 ^b	96,20 ± 2,45 ^{c,b}
C13a	> 12	46,54 ± 8,47 ^a
C24	1,03 ± 0,23 ^c	87,75 ± 5,20 ^{d,b}
C24a	5,02 ± 0,65 ^a	80,81 ± 7,20 ^e

(a) Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos, com medidas em duplicata.

(b) Porcentagem de inibição na maior concentração avaliada (12 µmol/L).

Análise estatística: letras diferentes representam diferença significativa para uma mesma coluna (p<0,05; ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

5. Discussão

A produção de ERO pelos neutrófilos representa um mecanismo essencial da imunidade inata contra agentes infecciosos. Sua produção pode ser desencadeada por fatores solúveis ou particulados, fagocitáveis ou não, incluindo IC opsonizados ou não por componentes do sistema complemento. Como mecanismo de neutralizar e eliminar os patógenos ou seus derivados, os IC são formados na circulação e interagem com receptores específicos na membrana dos neutrófilos, ativando suas funções de fagocitose, liberação do conteúdo dos seus grânulos e vesículas, e produção de EROs (CLARK; PETTY, 2010; LUERMAN et al., 2010; DUNKELBERGER; SONG, 2010).

Os IC são eliminados da circulação pela ligação dos mesmos aos CR1 dos eritrócitos, que os transporta até o baço e o fígado, onde são fagocitados pelos macrófagos residentes. Quando esse mecanismo é ineficiente e não consegue eliminar a carga de IC formada, ocorre a deposição desses IC nos vasos e tecidos. Esses IC promovem a ativação do sistema complemento, originando fatores quimiotáticos para neutrófilos circulantes. Estas células, por sua vez, são recrutadas para os sítios de acúmulo de IC e ativadas nestes locais, contribuindo para o estabelecimento de processos inflamatórios que podem se tornar crônicos e, por conseguinte, causar lesão tecidual, característico de diversas patologias (SCHMIDT; GESSNER, 2005; NIMMERJAHN; RAVETCH, 2008; KHERA; DAS, 2009).

Essa lesão tecidual ocasionada pela ativação inapropriada e exacerbada dos neutrófilos por ICs culmina na produção e liberação de ERO e enzimas lisossomais por essas células. Nessa ocasião, os mecanismos endógenos de defesa tecidual não são eficientes em controlar as alterações desencadeadas pelos fatores oxidantes e líticos, e a lesão tecidual resulta em possíveis alterações funcionais e estruturais no órgão alvo. Nessa perspectiva, tem-se intensificado a procura de novos compostos terapêuticos com capacidade de reduzir os efeitos deletérios da exposição dos tecidos adjacentes ao acúmulo de IC, ERO e enzimas líticas (JANCAR; CRESPO, 2005; TSUBOI et al., 2008; MAYADAS et al., 2009; JOVANOVIĆ et al., 2009; YU et al., 2010; HUANG et al., 2011).

Compostos naturais ou sintéticos, com conhecida atividade antioxidante, têm sido utilizados em estudos científicos, a fim de entender os seus mecanismos de ação e estabelecer protótipos de substâncias com aplicação farmacêutica capazes de minimizar os efeitos nocivos da ativação indesejada dos neutrófilos (KONTOGIORGIS et al., 2007; KHOABI et al., 2011). Os flavonóides são um grupo de compostos naturais que têm recebido destaque nesse campo de investigação por apresentarem características que os

tornam eficazes no combate ao estresse oxidativo, principalmente a presença de hidroxilas livres (PIETTA et al., 2000; SARKAR et al., 2011).

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos relatam os derivados 3-fenilcumarínicos, compostos sintéticos pertencentes ao grupo dos isoflavonóides, como substâncias com efetivo poder antioxidante frente ao metabolismo oxidativo de neutrófilos (KABEYA et al., 2008; ROUSSAKI et al., 2010). KABEYA e colaboradores (2008) estudaram um grupo de derivados 3-fenilcumarínicos frente ao metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados com IC, 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.

Visando o entendimento dos mecanismos de ação dos derivados 3-fenilcumarínicos estudados em trabalhos anteriores, o trabalho científico atual avaliou o potencial antioxidante de um conjunto de dez derivados 3-fenilcumarínicos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por IC. Esses compostos são estruturalmente análogos, diferindo quanto ao tipo (hidroxi ou acetoxi) e a quantidade (ausente, um, dois ou mais) de grupos substituintes, além da presença do grupo metilenodioxila ligado ao anel fenílico, que aumenta a lipofilicidade da molécula.

Os resultados deste trabalho mostraram que os derivados 3-fenilcumarínicos reduziram a produção de ERO pelos neutrófilos estimulados com IC, conforme se verificou pela inibição da QLlum e QLluc. Entre as dez amostras avaliadas, cinco (**C6**, **C13**, **C13a**, **C24** e **C24a**) inibiram 50% ou mais a QLlum ou QLluc, enquanto as demais substâncias (**C1**, **C15**, **C6a**, **C18**, **C18a**) apresentaram ação inibitória pouco expressiva na maior concentração avaliada, de 20 $\mu\text{mol/L}$. Além disso, as substâncias ativas foram capazes de inibir a QLlum e a QLluc de modo dependente de concentração. Este efeito inibitório das 3-fenilcumarinas sobre a função celular avaliada não está relacionado com citotoxicidade, pois a viabilidade celular não foi significativamente alterada, nas condições investigadas.

De maneira geral, a inibição da QLlum e QLluc pelos derivados 3-fenilcumarínicos parece estar relacionada com a presença dos grupos substituintes hidroxi e acetoxi, tendo em vista que os cinco compostos mais ativos os possuem. Além disso, aquelas substâncias que possuem hidroxilas livres, de forma geral, tiveram efeito inibitório maior que os

análogos acetilados, tanto na QLlum quanto na QLluc. De acordo com BORS et al. (1990), citado por SARKAR et al. (2011) essa é uma das características mais importantes para que uma substância desempenhe atividade antioxidante, visto que os grupos hidroxil podem atuar como sequestradores de radicais superóxido.

De modo geral, as fenilcumarinas avaliadas foram significativamente mais efetivas em inibir a QLlum do que a QLluc. A única exceção foi a substância **C6**, que apresentou o mesmo perfil de inibição tanto para a QLlum quanto para a QLluc, indicando uma atuação semelhante em ambos os processos.

Dentre as substâncias avaliadas, **C13** foi a mais efetiva em inibir a QLluc. Essa amostra possui um grupo substituinte orto-diidroxil nas posições C-6 e C-7 do esqueleto cumarínico e uma metilenodioxila ligada ao anel fenílico, que favorece a inserção em membranas biológicas, sendo essa característica de lipofilicidade também importante para a atividade antioxidante de determinadas substâncias pelo fato de que aumenta a biodisponibilidade e a interação com os sistemas biológicos (VAN ACKER et al., 1998; VUOTTO et al. 2003). Os resultados encontrados para as amostras **C6** e **C18** parecem corroborar com essa informação, visto que o efeito inibitório maior de **C6** indica a importância do grupo lipofílico (metilenodioxila) ligado ao anel fenílico, servindo também como grupo carreador da molécula para o espaço intracelular, sugerindo ainda que essa amostra possua alvos intracelulares de atuação, e não apenas o sequestro das ERO extracelulares.

MOREIRA e colaboradores (2007) mostraram a importância da lipofilicidade na modulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos por flavonóides. Por meio do cálculo do coeficiente de partição dos flavonóides, eles verificaram que as moléculas mais lipofílicas apresentam um maior efeito inibitório da QL. Além disso, segundo esses autores, os flavonóides quercetina, kaempferol e galangina, que promovem um pequeno mas significativo aumento na fluidez de membrana, também possuem maior efeito inibitório na QL.

De forma geral, a QLluc, que diz respeito a detecção da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), foi inibida mais significativamente pela substância **C13**, que combinou essas duas características: um grupo substituinte orto-diidroxil no esqueleto cumarínico e um grupo metilenodioxila no anel fenílico. A substância **C13a**, com substituições acetoxi, análogo ao **C13**, não mostrou o mesmo padrão de inibição da QLluc, nem contudo (**C1**) que possui somente o grupo adicional que aumenta a lipofilicidade.

Para a QLLum, os derivados 3-fenilcumarínicos **C13** e **C24** foram os mais ativos em inibir o metabolismo oxidativo, apresentando perfil de inibição semelhante, baseado no valor de IC₅₀. Esses dois compostos têm em comum a presença do grupo substituinte 6,7-diidroxi, mas diferem quanto ao grupo substituinte do anel fenílico, sendo metilenodioxila para **C13** e 3',4'-diidroxi para **C24**. Vale salientar ainda que o derivado 3-fenilcumarínico **C24a**, que é o análogo acetilado de **C24**, apresentou um perfil de inibição bem próximo desse último.

Nesse contexto, o número e a posição dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi parecem influenciar a atividade antioxidante dos derivados 3-fenilcumarínicos. Além disso, esse efeito é dependente de concentração, o que confirma os resultados encontrados por KABEYA et al. (2008) em modelo experimental de neutrófilos de coelho estimulados com IC. No entanto, o presente trabalho diverge do conjunto de dados anteriores em um aspecto: os derivados 3-fenilcumarínicos com grupos substituintes hidroxilados apresentaram um efeito inibitório da QLLuc e da QLLum mais expressivo do que os compostos com grupos substituintes acetoxilados, análogos ou não aos primeiros, que no trabalho anterior foram os mais ativos.

A substituição de grupos hidroxí por acetoxi nos polifenóis aumenta a lipofilicidade dessas moléculas, favorecendo a interação e a disponibilidade com os sistemas biológicos (CHEN et al., 2001; KUMAR et al., 2005). Além do mais, enzimas esterases presente nas células são capazes de converter esses grupos em substituintes hidroxí. Sugere-se que essa hidrólise pode ser parcial, e o potencial antioxidante do produto hidroxilado formado pode ser diferente do perfil da substância hidroxilada nativa. O citoplasma dos neutrófilos é rico em esterases, cujas quantidades variam conforme a espécie animal (HALLETT et al., 1996). Isso pode ser a razão da divergência de resultados encontrados entre os dois trabalhos, mostrando que em neutrófilos humanos, o uso de substâncias antioxidantes com substituições acetoxi, que poderia favorecer a biodisponibilidade, não apresenta vantagens quando comparadas com análogos hidroxilados.

A ativação de neutrófilos via receptores Fcγ associado ou não a CR leva à formação do complexo enzimático da NADPH oxidase e ao aumento do consumo de O₂. Para que a produção de ERO ocorra é necessário que as moléculas que formam o complexo enzimático sofram fosforilações, causando rearranjos favoráveis à montagem da enzima ativa na membrana. Essa enzima tem sido alvo de estudos terapêuticos visando minimizar os danos oxidativos ocasionados pela sua ativação exacerbada, que tem sido relacionada à

patofisiologia de inúmeras doenças (EL-BENNA et al., 2010; KIM et al., 2011; DHIMAN; GARG, 2011).

Para investigar se a inibição da QLuc estava relacionada à ação dos derivados 3-fenilcumarínicos na atividade da NADPH oxidase, foi avaliado o consumo de O_2 por neutrófilos estimulados com IC. Os resultados sugerem que as substâncias avaliadas (**C6**, **C13**, **C24**, **C24a**) interferem discretamente na montagem ou funcionamento do complexo enzimático, pois a inibição do consumo de O_2 ficou em torno de 5-7%, quando comparada com DPI, que é o inibidor padrão da NADPH oxidase. O derivado **C6** foi o mais efetivo em inibir o consumo de O_2 por meio desse método de análise. Dessa forma, a inibição da QLuc parece estar predominantemente relacionada ao efeito “scavenger” de superóxido das substâncias (KABEYA et al., 2007; ROUSSAKI et al., 2010).

Uma inibição de 5-7% do consumo de O_2 pelos neutrófilos ativados, apesar de pequena, pode ser interessante dentro do contexto inflamatório. Vale salientar que as funções efetoras dessas células são essenciais para a defesa imune inata contra patógenos extracelulares e, portanto, a inibição acentuada das suas funções pode favorecer o estabelecimento de infecções. Além do mais, é sabido que as ERO desempenham papéis relacionados à sinalização celular e que o balanço redox é de grande importância para a manutenção das funções fisiológicas normais das células como proliferação, quimiotaxia e apoptose (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004; FILIPPIN et al., 2008; ADLER et al., 2009).

Estudos experimentais com modelos animais e evidências epidemiológicas de estudos com indivíduos portadores de doença granulomatosa crônica, onde se observa a deficiência na montagem e/ou funcionamento do complexo enzimático da NADPH oxidase, apontam que a diminuição ou ausência total da produção de ERO torna os organismos mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças autoimunes. É sugerido que o balanço redox influencia as etapas de apresentação de antígenos e também as vias de sinalização intracelular que proporcionam a regulação de processos inflamatórios, favorecendo o estabelecimento de tais doenças (HADDAD, 2002; HULTQVIST et al., 2009). Portanto, efeitos prejudiciais ao organismo podem ser observados tanto em decorrência da produção exacerbada quanto da ausência ou redução significativa dessas espécies oxidantes. Dessa forma, é importante manter uma concentração adequada de ERO, ou seja, modular a sua produção e não inibi-la totalmente.

Após a produção de $O_2^{\bullet -}$ pela NADPH oxidase, este radical pode ser convertido, espontaneamente ou por ação da superóxido dismutase, em H_2O_2 . Em etapas subsequentes

do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, o H_2O_2 , juntamente com íons Cl^- , são utilizados como substratos pela enzima MPO para a produção de HOCl, um composto extremamente potente na destruição de patógenos (WINTERBOURN; KETTLE, 2004). Além do HOCl, outras ERO produzidas podem ser detectadas pela QLum. Dentro deste contexto, com o objetivo de investigar a relação entre a inibição da QLum pelos derivados 3-fenilcumarínicos e o efeito dessas substâncias na atividade da MPO ou no sequestro de HOCl, foram realizados ensaios em sistemas livres de células, conforme discutido a seguir.

A inibição da atividade da MPO parece estar relacionada com o número de hidroxilas na estrutura do derivado 3-fenilcumarínico, pois foi observada a seguinte ordem de efeito inibitório: **C24** > **C13** > **C6**. A substância **C24**, que apresentou o maior efeito inibitório da atividade da MPO, possui quatro grupos hidroxila em sua estrutura, enquanto a fenilcumarina **C13**, que apresentou aproximadamente metade do efeito inibitório do **C24**, possui dois desses grupos e a amostra **C6**, com apenas um grupo hidroxila, foi a menos ativa.

De acordo com KABEYA et al. (2007), que avaliou o efeito de derivados 3-fenilcumarínicos e flavonóides sobre a atividade catalítica da HRP, o grupo catecol é importante para a atividade inibitória que essas substâncias apresentam, pois a remoção de grupos hidroxilas nas amostras mais ativas levou à redução desse efeito. Além disso, os autores mostram que a localização do grupo hidroxila também é importante para a inibição da atividade HRP pelas fenilcumarinas. No presente trabalho, as análogas acetoxiladas (**C13a** e **C24a**) das amostras mais ativas em inibir a atividade da MPO (**C13** e **C24**), não apresentaram efeito inibitório significativo. Isso sugere que é importante que o grupo OH esteja livre para que a substância atue sobre a MPO.

De maneira geral, a atividade inibitória da MPO pelos derivados 3-fenilcumarínicos estudados está relacionada ao número e à posição dos grupos substituintes hidroxil, independente do método empregado para analisar esse efeito. Esta conclusão fundamenta-se no fato de que os resultados obtidos são condizentes com os dados reportados por KABEYA et al. (2007), que utilizou como método de análise o sistema livre de célula baseado na reação HRP- H_2O_2 -luminol.

A atividade “scavenger” de HOCl pelos derivados 3-fenilcumarínicos revelou que essas substâncias são hábeis em exercer tal função, que parece estar relacionada com o número de grupos hidroxilas na estrutura das substâncias. A atividade “scavenger” de

HOCl seguiu a mesma ordem de resposta observada para a atividade inibitória da MPO pelas amostras: **C24 > C13 > C6**.

A habilidade dos flavonóides e substâncias semelhantes em exercer atividade “scavenger” de radicais livres já é bem descrita na literatura. De acordo com BORDS et al. (1990) citado por PIETTA et al. (2000), essas substâncias apresentam tal capacidade por possuírem características que incluem grupos substituintes com estruturas do tipo orto-diidroxil no anel B, presença de hidroxilas adicionais no anel A e dupla ligação 2-3 conjugada com a função 4-oxo. Os derivados cumarínicos também apresentam atividade “scavenger” de radicais livres (KHOABI et al. 2011; SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

ROUSSAKI e colaboradores (2010) verificaram que o efeito “scavenger” de radicais de um grupo de fenilcumarinas estava diretamente relacionado com a presença de grupos catecol na estrutura dessas amostras o que, segundo eles, possibilita a doação de elétrons e consequente neutralização dos radicais formados. Além disso, a substituição dos grupos hidroxilas por grupos metila reduziu significativamente o efeito dessas substâncias quanto à capacidade “scavenger” de radicais. KABEYA et al. (2007) encontraram resultados semelhantes quando analisaram o efeito “scavenger” de radicais de um grupo diferente de derivados 3-fenilcumarínicos.

Os resultados deste trabalho sugerem que a atividade antioxidante dos derivados 3-fenilcumarínicos estudados, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados com IC, está relacionada com as características estruturais dessas moléculas. Dentre a série de substâncias avaliadas, **C13** e **C24** são as amostras mais promissoras para uso como protótipo de criação de uma molécula com aplicação terapêutica em doenças causadas pela ativação exacerbada de neutrófilos. Tanto a amostra **C13** como a **C24** inibiram expressivamente o metabolismo oxidativo de neutrófilos, como também a enzima MPO, além de atuarem ativamente como “scavenger” de radicais livres. No entanto, estudos adicionais são necessários para entender melhor os mecanismos de ação dessas substâncias.

6. Conclusão

Os resultados desse trabalho mostram que os derivados 3-fenilcumarínicos são um grupo de substâncias sintéticas que podem ser utilizadas como moduladoras do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por IC. De maneira geral, os dez compostos analisados inibiram a produção de ERO, sendo que a intensidade de inibição está relacionada com o tipo, número e posição dos grupos substituintes. Além disso, este efeito inibitório não está relacionado com citotoxicidade, pois a viabilidade celular não foi significativamente alterada, nas condições investigadas.

A QLuc, que diz respeito a detecção da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), foi inibida mais significativamente pela substância **C13**, que possui duas características que parecem estar relacionadas com tal efeito: um grupo substituinte orto-diidroxi no esqueleto cumarínico e um grupo metilenodioxila no anel fenílico. Além do mais, todas as substâncias que possuem o grupo metilenodioxila no anel fenílico apresentaram maior efeito inibitório da QLuc, quando comparadas às respectivas análogas sem este grupo substituinte, sugerindo a importância da lipofilicidade da molécula.

Os derivados 3-fenilcumarínicos avaliados (**C6**, **C13**, **C24**, **C24a**) não interferiram de modo significativo na atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase, pois a inibição do consumo de O_2 foi discreta, ficando em torno de 5-7%. Dessa forma, a inibição da QLuc está provavelmente relacionada ao efeito “scavenger” de superóxido das substâncias.

Considerando-se a QLum, os derivados 3-fenilcumarínicos **C13** e **C24** apresentaram os maiores efeitos inibitórios dentre as amostras avaliadas. Estas duas substâncias, cujos valores de IC_{50} foram semelhantes entre si, têm em comum a presença do grupo substituinte 6,7-diidroxi, mas diferem quanto ao grupo substituinte do anel fenílico, sendo metilenodioxila para **C13** e 3',4'-diidroxi para **C24**. Isto indica que a maior importância das hidroxilas livres no anel cumarínico em relação ao anel fenílico para a atividade biológica.

A inibição da atividade da enzima MPO parece estar diretamente relacionada ao número de hidroxilas na estrutura do derivado 3-fenilcumarínico, pois as amostras com maior efeito inibitório, **C24** e **C13**, possuem maior quantidade desses grupos substituintes, ao passo que a amostra **C6**, com apenas um grupo hidroxila, foi menos ativa.

A avaliação da atividade “scavenger” de HOCl dos derivados 3-fenilcumarínicos revelou que essas substâncias são hábeis em exercer tal função, que parece ser dependente do número de grupos hidroxilas na estrutura das substâncias, pois **C24** e **C13** foram as amostras mais ativas.

De modo geral, o que se observa é que tanto nos modelos celulares quanto nos livres de célula, utilizados neste trabalho para avaliação de atividade antioxidante, a presença das hidroxilas livres é importante.

Referências

- ABDALLAH, D. S. A.; EGAN, C. E.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Mouse neutrophils are professional antigen presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. **International Immunology**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 317–326, 2011.
- AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, Paris, v. 74, p. 324–329, 2007.
- ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K. D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, p. 6104–6111, 1999.
- AHMAD, A.; MONDELLO, S.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; CATANIA, M. A.; ITALIANO, D.; MONDELLO, P.; ALOISI, C.; CUZZOCREA, S. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: A comparison with n-acetylcysteine. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 674, p. 397–406, 2012.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 30, p. 459–89, 2012.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 500, p. 92–106, 2010.
- BELOSTOCKI, K.; PARK, M. S.; REDECHA, P. B.; MASUDA, E.; SALMON, J. E.; PRICOP, L. FcγRIIa is a target for modulation by TNFα in human neutrophils. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 117, p. 78–86, 2005.
- BELLUTI, F.; FONTANA, G.; BO, L. D.; CARENINI, N.; GIOMMARELLI, C.; ZUNINO, F.; Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, p. 3543–3550, 2010.
- BERTOLOTTO, M.; DALLEGRI, F.; DAPINO, P.; QUERCIOLI, A.; PENDE, A.; OTTONELLO, L.; MONTECUCCO, F. Sulphasalazine accelerates apoptosis in neutrophils exposed to immune complex: role of caspase pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 36, p. 1132–1135, 2009.
- BISSONNETTE, E.Y.; TREMBLAY, G.M.; TURMEL, V.; PIROTTE, B.; REBOUD-RAQVAUX, M. Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation in vivo. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.9, n.1, p.49–54 2009.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, Cambridge, v. 33, p. 657–670, 2010.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 343–355, 1990.

BOUMA, G.; ANCLIFF, P. J.; THRASHER, A. BURNS, J.; S. O. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 151, p. 312–326, 2010.

BOURNAZOS, S.; WOOF, J. M.; HART, S. P.; DRANSFIELD, I. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 157, p. 244–254, 2009.

BRUHNS, P.; IANNASCOLI, B.; ENGLAND, P.; MANCARDI, D. A.; FERNANDEZ, N.; JORIEUX, S.; DAËRON, M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, New York, v. 113, p. 3716–3725, 2009.

BYLUND, J.; BROWN, K. L.; MOVITZ, C.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 49, p. 1834–1845, 2010.

CARTER, G. T. Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. **Natural Products Reports**, London, v. 28, p. 1783–1789, 2011.

CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H. S.; FONSECA, J. E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatológica Portuguesa**, Lisboa, v. 34, p. 313–326, 2009.

CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H. S.; SOUTO-CARNEIRO, M. M.; FONSECA, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 9, p. 531–535, 2010.

CHEN, Y. C.; SHEN, S. C.; LEE, W. R.; HOU, W. C.; YANG, L. L.; LEE, T. J. F. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 82, p. 537–548, 2001.

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**, New York, v. 261, p. 153–158, 2010.

CORSINI, E.; LUCCHI, L.; BINAGLIA, M.; VIVIANI, B.; BEVILACQUA, C.; MONASTRA, G.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L. Cloricromene a semi-synthetic coumarin derivative, inhibits tumor necrosis factor-α production at a pre-transcriptional level. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 418, p. 231–7, 2001.

COSTA, C.; GERMENA, G.; HIRSCH, E. Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 10, p. 1826–1839, 2010.

CROSS, A.; BAKSTAD, D.; ALLEN, J. C.; THOMAS, L. R.; MOOTS, J.; EDWARDS, S. W. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, Amsterdam, v. 12, p. 191–202, 2005.

- DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 232, p. 3–14, 1999.
- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, New York, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.
- DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. **Journal of Pathology**, London, v. 225, p. 583–596, 2011.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, Beijing, v. 20, p. 34-50, 2010.
- DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 39, p. 1468 – 1477, 2005.
- EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; MARIE, J. C.; BRAUT-BOUCHER, F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Experimental and Molecular Medicine**, Seoul, v. 41, n. 4, p. 217-225, 2009.
- EL-BENNA, J.; DANG, P. M. C.; PERIANIN, A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 80, p.778–785, 2010.
- EL-SEEDI, H. R. Antimicrobial Arylcoumarins from *Asphodelus microcarpus*. **J. Nat. Prod**, Cincinnati, v. 70, p. 118-120, 2007.
- FAHEY, J. L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R. The immunoglobulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins: 7S2, ES1, 1A, 2A and 18S1M - globulins. *Journal of Experimental Medicine*, New York. v. 120, p.223, 1964.
- FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Redox signaling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 152, p. 415–422, 2008.
- FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLE, V.; GRINSTEIN, S. The Cell Biology of Phagocytosis. **Annual Review of Pathology – Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 7, p. 49–86, 2012.
- FRESHNEY, R. I. Measurement of viability and cytotoxicity. In:_____. **Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Techniques**. 3 ed. New York: John Wiley e Sons, cap. 19, p. 287-307, 1994.
- GARCIA-ARGÁEZ, A. N.; APAN, T. O. R.; DELGADO, H. P.; VELAZQUEZ, G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarin from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, p. 279-281, 2000.

GHATE, M.; KUSANUR, R. A. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 40, p. 882–887, 2005.

GRIMM, E. L.; BRIDEAU, C.; CHAURET, N.; CHAN, C.-C.; DELORME, D.; DUCHARME, Y.; ETHIER, D.; FALGUEYRET, J.-P.; FRIESEN, R. W.; GUAY, J.; HAMEL, P.; RIENDEAU, D.; SOUCY-BREAU, C.; TAGARI, P.; GIRARD, Y. Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors. **Bioorganic and Medical Chemistry Letters**, Oxford, v. 16, p. 2528-2531, 2006.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, Oxford, v. 14, p. 879–897, 2002.

HAGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 268; p. 25–34, 2010.

HALLETT, M. B.; DAVIES, E. V.; PETTIT, E. J. Fluorescent methods for measuring and imaging cytosolic free Ca^{2+} in neutrophils. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 9, p. 591–606 1996.

HALLIWELL, B. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford, Clarendon Press, 1999. 936 p.

HAPNER, C. D.; DEUSTER, P.; CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 186, p. 275–279, 2010.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 107, n. 6, p. 1535-1546, 1971.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H. H. W.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R. P. Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. **Hypertension**, Dallas, v. 51, p. 211-217, 2008.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, London, v. 6, p. 265-278, 2004.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. **General Pharmacology**. Oxford, v. 27, p. 713-722, 1996.

HUANG, Z. Y.; HUNTER, S.; CHIEN, P.; KIM, M. K.; HAN-KIM, T. H.; INDIK, Z. K.; SCHREIBER, A. D. Interaction of two phagocytic host defense systems: Fcγ receptors and complement receptor 3. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 1, p. 160–168, 2011.

HULTQVIST, M.; OLSSON, L. M.; GELDERMAN, K. A.; HOLMDAHL, R. The protective role of ROS in autoimmune disease. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 30, p. 201-208, 2009.

JANCAR, S.; CRESPO, M. S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 26, p. 48-55, 2005.

JOVANOVIĆ, V.; DAI, X.; LIM, Y. T. KEMENY, D. M.; MACARY, P. A. Fcγ receptor biology and systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, Oxford, v. 12, p. 293-298, 2009.

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

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. 192f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2006.

KABEYA, L. M.; MARCHI, A. A.; KANASHIRO, A.; LOPES, N. P.; SILVA, C. H. T. P. da; PUPO, M. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medical Chemistry**, Oxford, v. 15, p. 1516-1524, 2007.

KABEYA, L. M.; SILVA, C. H. T. P. da; KANASHIRO, A.; CAMPOS, J. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; POLIZELLO, A. C. M.; PUPO, M. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. 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 Medical Chemistry**, Oxford, v. 43, p. 996-1007, 2008.

KHAN, I.A.; KULKARNI, M.V.; GOPAL, M.; SHAHABUDDIN, M.S.; SUN, C.M. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, n.15, p.3584-7, 2005.

KHERA, R.; DAS, N. Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 46, p. 761-772, 2009.

KHOABI, M.; EMAMI, S.; DEHGHAN, G.; FOROUMADI, A.; RAMAZANI, A.; SHAFIEE, A. Synthesis and free radical scavenging activity of coumarin derivatives containing a 2-methylbenzothiazoline motif. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 344, p. 588-594, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 77, p. 598-625, 2005

KLEIN, J. **Immunology**. Blacwell Scientific Publications, 1990. Cap. 13, p. 311-334: Defense reactions mediated by phagocytes.

KIM, H.J.; JANG, S.I.; KIM, Y.J.; CHUNG, H.T.; YUN, Y.G.; KANG, T.H.; JEONG, O.S.; KIM, Y.C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, Milano, v.75, p.261-6, 2004.

KIM, S. Y.; KIM, T. B.; MOON, K. A.; KIM, T. J.; SHIN, D.; CHO, Y. S.; MOON, H. B.; LEE, K. Y. Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species *in vitro* and *in vivo*. **Experimental and Molecular Medicine**, Seoul, v. 40, n°. 4, p. 461-476, 2008.

KIM, S. Y.; MOON, K.-A.; JO, H.-Y.; JEONG, S.; SEON, S.-H.; JUNG, E.; CHO, Y. S.; CHUN, E.; LEE, K.-Y. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, p. 1-8, 2011.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Synthesis and anti-inflammatory activity of coumarin derivatives. **Journal of Medical Chemistry**, Easton, v. 48, p. 6400-6408, 2005.

KONTOGIORGIS, C. A.; SAVVOGLOU, KYRIAKOS.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, Basingstoke, v. 21, n. 1, p. 21-29, 2006.

KONTOGIORGIS, C. A.; XU, Y.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; LUO, YUAN. Coumarin derivatives protection against ROS production in cellular models of Ab toxicities. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 41, n. 10, p. 1168-1180, 2007.

KUIJPERS, T. W. Clinical symptoms and neutropenia: the balance of neutrophil development, functional activity, and cell death. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 161, p. 75-82, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBINS, S.L.; COTRAN, V. **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 10, p. 1325-1334, 2010.

LAMBETH, J. D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, p. 181-189, 2004.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, New York, v. 325. p. 161-165, 2009.

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

- LUCISANO-VALIM, Y. M.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SILVA, S. C.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MANTOVANI, B. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complex. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 47, p. 53-58, 2002.
- LUERMAN, G. C.; URIARTE, S. M.; RANE, M. J.; MCLEISH, K. R. Application of proteomics to neutrophil biology. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 552–561, 2010.
- LU, J.; ELLSWORTH, J. L.; HAMACHER, N.; OAK, S. W.; SUN, P. D. Crystal structure of Fcγ receptor I and its implication in high affinity γ-immunoglobulin binding. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 47, p. 40608–40613, 2011.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 11, p. 519-531, 2011.
- MARCHI, A. A.; CASTILHO, M. S.; NASCIMENTO, P. G. B.; ARCHANJO, F. C.; DEL PONTE, G.; OLIVA, G.; PUPO, M. T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medical Chemistry**, Oxford, v. 12, p. 4823-4833, 2004.
- MATOS, M. J.; TERAN, C.; PEREZ-CASTILLO, Y.; URIARTE, E.; SANTANA, L.; VINA, D. Synthesis and study of a series of 3-aryl coumarins as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 54, p. 7127–7137, 2011.
- MAYADAS, T. N.; TSOKOS, G. C.; TSUBOI, N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. **Circulation**, Dallas, v. 120, p. 2012-2024, 2009.
- METZLER, K. D.; FUCHS, T. A. NAUSEEF, W. M.; REUMAUX, DOMINIQUE.; ROESLER, JOACHIM. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood**, New York, v. 117, p. 953-959, 2011.
- MLADENKA, P.; ZATLOUKALOVÁ, L.; FILIPSKY, T.; HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 49 p, 963–975, 2010.
- NOSAL, R.; PEREKO, T.; JANEINOVA, V.; DRABIKOVA, K.; HARMATHA, J.; SVITEKOVA, K. Naturally appearing N-feruloylserotonin isomers suppress oxidative burst of human neutrophils at the protein kinase C level. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 63, p. 790-798, 2011.
- MOREIRA, M. R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C.S.; CURTI, C.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, A. T.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement

receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, p. 317–326, 2007.

MORENA, M.; CRISTOL, J. P.; CAL, L.; LERAY-MORAGUES, H.; KRIETER, D.; CANAUD, B. Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit? **Kidney International**, Malden, v. 61, p. 109–114, 2002.

NEYTS, J.; CLERCQ, E.; SINGHA, R.; CHANG, Y. H.; DAS, A. R.; CHAKRABORTY, S. K.; HONG, S. C.; TSAY, S. C.; HSU, M. H.; HWU, J. R. Structure-activity relationship of new anti-hepatitis c virus agents: heterobicycle-coumarin conjugates. **J. Med. Chem.**, Easton, v. 52, p. 1486–1490, 2009.

NIEDERER, H. A.; CLATWORTHY, M. R.; WILLCOCKS, L. C.; SMITH, K. G. C. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1183, p. 69–88, 2010.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, p. 34–47, 2008.

NKENGFAK, A. E.; WAGGO, A. K.; AZEBAZE, G. A.; FOMUM, Z. T.; MEYER, M.; BODO, B.; VAN KEERDEN, F. R. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina indica*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 6, p. 855–856, 2000.

NUNES, P.; DEMAUREX, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 88, p. 57–68, 2010.

NUUTILA, J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophils cell surface FcγRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 23, p. 268–274, 2010.

OLIVEIRA-JUNIOR, E. B.; BUSTAMANTE, J.; NEWBURGER, P. E.; CONDINO-NETO, A. The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 73, p. 420–427, 2011.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. **Progress in Allergy**. Basel. v. 15, p. 1–78. 1958.

PARKER, H.; ALBRETT, A. M.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase associated with neutrophils extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 91, p. 1–8, 2012.

PAULSSON, J. M.; JACOBSON, S. H.; JOSEFIN, J. L. Neutrophil activation during transmigration in vivo and in vitro a translational study using the skin chamber model. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 361, p. 82–88, 2010.

PETRY, A.; WEITNAUER, M.; GORLACH, A. Receptor activation of NADPH oxidases. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 13, n. 4, p. 467–487, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PROKOPOWICZ, Z.; MARCINKIEWICZ, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Warszawa, 2011.

RADSTAKE, T. R. D. J.; FRANKE, B.; WENINK, M. H.; NABBE, K. C. A. M.; COENEN, M. J. H.; WELSING, P.; BONVINI, E.; KOENIG, S.; VAN DEN BERG, W. B.; BARRERA, P.; AND VAN RIEL, P. L. C. P. L. C. M. The functional variant of the inhibitory Fcγ receptor IIb (CD32B) is associated with the rate of radiologic joint damage and dendritic cell in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v. 54, n. 12, p. 3828-3837, 2006.

RAGHAV, S.K.; GUPTA, B.; SHRIVASTAVA, A.; DAS, H.R. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase and IL-1β through suppression of NF-κappaB activation by 3-(1'-1'-dimethyl-allyl)-6-hydroxy-7-methoxy-coumarin isolated from *Ruta graveolens* L. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.560, p.69–80, 2007.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 72, p. 1439–1452, 2006.

RAMSLAND, P. A.; FARRUGIA, W.; BRADFORD, T. M.; SARDJONO, C. T.; ESPARON, S.; TRIST, H. M.; POWELL, M. S.; TAN, P. S.; CENDRON, A. C.; WINES, B. D.; SCOTT, A. M.; HOGARTH, P. M. Structural basis for FcγRIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 187, p. 3208-3217, 2011.

RAZA, K.; SCHEEL-TOELLNER, D.; LEE, C.-Y.; PILLING, D.; CURNOW, S. J.; FALCIANI, F.; TREVINO, V.; KUMAR, K.; ASSI, L. K.; LORD, J. M.; GORDON, C.; BUCKLEY, C. D.; SALMON, M. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 8, n. 4, 2006.

REGASINI, L.O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, Oxford, v.69, p.1739–1744, 2008.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, New York, v. 11, n. 9, 2010.

ROMERO, M.; JIMENEZ, R.; SANCHEZ, M.; LOPEZ-SEPULVEDA, R.; ZARZUELO, M. J.; OVALLE, F. A.; ZARZUELO, A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 202, p. 58–67, 2009.

ROUSSAKI, M.; KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; HAMILAKIS, S.; DETSI, A. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 20, p. 3889–3892, 2010.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; SANTOS, G. B.; FUZISSAKI, C. N.; DEROGIS, P. B. M. C.; FREITAS, L. A.S.; GONTIJO, V. S.; STRINGHETA, P. C.; NAGEM, T. J.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; SANTOS, M. H. 7-Epiclusianone, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. **Journal of Medicinal Food**. Larchmont, v. 15, n. 2, p. 200-205, 2012.

SARKAR, A.; MIDDYA, T. R.; JANA A. D. A QSAR study of radical scavenging antioxidant activity of a series of flavonoids using DFT based quantum chemical descriptors – the importance of group frontier electron density. **Journal of Molecular Modeling**, Berlin, 2011.

SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; CHATTERJEE, M.; RAO, K. B.; SINGH, S.; VERMA, A. K.; PALIT, G. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 21, p. 1937–1941, 2011.

SCHMIDT, R. E.; GESSNER, J. E. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.100, p. 56–67, 2005.

SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 89, p. 359-372, 2011.

SIMARD, J. C.; GIRARD, D.; TESSIER, P. A. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 87, p. 905-914, 2010.

SKATTUM, L.; VAN-DEUREN, VAN DER POLL, M.; TRUEDSSONA, T. L. Complement deficiency states and associated infections. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 48, p. 1643–1655, 2011.

SOEHNLEIN, O.; WEBER, C.; LINDBOM, L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 30, n.11, p. 538-546, 2009.

STEEVELS, T. A.; MEYAARD, L. Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 41, p. 575-587, 2011.

SUMMERS, C.; RANKIN, S. M.; CONDLIFFE, A. M.; SINGH, N.; PETERS, A. M.; CHILVERS, E. R. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 31, p. 318–324, 2010.

TAWATA, M.; YODA, Y.; AIDA, K.; SHINDO, H.; SASAKI, H.; CHIN, M.; ONAYA, T. Anti-platelet action of GU-7, a 3 -aryl coumarin derivative, purified from *Glycyrrhizae Radix*. **Planta Med**, Stuttgart, v. 56, p. 259-263, 1990.

THUONG, P. T.; HUNG, T. M.; NGOC, T. M.; HA, D. T.; MIN, B. S.; KWACK, S. J.; KANG, T. S.; CHOI, J. S.; BAE, K. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure–activity relationships. **Phytother. Res**, London, v. 24, p. 101–106, 2010.

TSUBOI, N.; ASANO, K.; LAUTERBACH, M.; MAYADAS, T. N. Human neutrophil Fc γ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. **Immunity**, Cambridge, v. 28, p. 833–846, 2008.

TUNALI, T.; YARAT, A.; BULUT, M.; EMEKLI, N. 6,7-Dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 126, p. 226–230, 2004.

URIARTE, S. M.; RANE, M. J.; LUERMAN, G. C.; BARATI, M. T.; WARD, R. A. NAUSEEF, W. M.; MCLEISH, K. R. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 187, p. 391-400, 2011.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN BALEN, G. P.; VAN DEN BERG, D. J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W. J. F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 56, p. 935–943, 1998.

VAN DER POEL, C. E.; SPAAPEN, R. M.; VAN DE WINKEL, J. G. J.; LEUSEN, J. H. W. Functional Characteristics of the High Affinity IgG Receptor, Fc γ RI. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 186, p. 2699-2704, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN DER VEEN, B. S.; WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, Larchmont, v. 11, n. 11, p. 2899-2937, 2009.

VILAR, S.; QUEZADA, E.; SANTANA, L.; URIARTE, E. YANEZ, M.; FRAIZ, N.; ALCAIDE, C.; CANOB, E.; ORALLO, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 16, p. 257–261, 2006.

VLADIMIROV, Y. A.; PROSKURNINA, E. V. Free radicals and cell chemiluminescence. **Biochemistry**, Moscow, v. 74, p. 1545-1566, 2009.

VUOTTO, M.L.; MIRANDA, R.; RITIENI, A.; BASILE, A.; RICCIARDI, L.; DI PRISCO, R.; NICOLOSI, G.; MASCOLO, N. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (–)-3-Ovaleryl

substitution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 55, n. 3, p. 399–405, 2003.

YU, X.; HOLDORF, K.; KASPER, B.; ZILLIKENS, D.; LUDWIG, R. J.; PETERSEN, F. Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 130, p. 2841-2844, 2010.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.320, n. 6, p. 365-376, 1989.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Reaction of superoxide with myeloperoxidase and its products. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 57, p. 31-33, 2004.

WONG, S. H.; FRANCIS, N.; CHAHAL, H.; RAZA, K.; SALMON, M.; SCHEEL-TOELLNER, D.; LORD, J. M. Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. **Rheumatology**, Oxford, v. 48, p. 39–44, 2009.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

ZHANG, C. Y.; BOOTH, J. W. Differences in endocytosis mediated by Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 49, p. 329– 337, 2011.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed, Cap. 23, p. 578-614, 2004.

Anexos

Anexo A - Aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo CEP

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

Of. CEP/FCFRP nº. 30/2010
kms

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2010.

Ilma. Sra.

PROF.^a. DR.^a. YARA MARIA LUCISANO VALIM

Pós-graduando MICÁSSIO FERNANDES DE ANDRADE

Depto. de Física e Química - FCFRP - USP

Assunto: **Aprovação de protocolo de pesquisa.**

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 79^a Sessão Ordinária, realizada em 01/07/2010, o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO MODULATÓRIO DE DERIVADOS FENILCUMARÍNICOS NAS FUNÇÕES EFETORAS DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ESTIMULADOS POR IMUNOCOMPLEXOS: IMPLICAÇÃO NO MECANISMO DE AÇÃO", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 182.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

Anexo B - Aprovação do Protocolo de Pesquisa pelo CEUA

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