

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina
nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos
e análise da relação estrutura-atividade.”

Luciana Mariko Kabeya

Ribeirão Preto

2006

LUCIANA MARIKO KABEYA

“Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina
nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos
e análise da relação estrutura-atividade.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Ribeirão Preto
2006

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Kabeya, Luciana Mariko

Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura-atividade. Ribeirão Preto, 2006.

192 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Lucisano-Valim, Yara Maria.

1. Neutrófilos. 2. Imunocomplexos. 3. Cumarinas. 4. Relação estrutura-atividade. 5. Antioxidantes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Luciana Mariko Kabeya

Título: Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura-atividade.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Aprovado pela Comissão Julgadora em: ____/____/____.

Agradecimientos

Tempo Certo

De uma coisa podemos ter certeza:

*De nada adianta querer apressar as coisas;
tudo vem a seu tempo, dentro do prazo que lhe foi previsto,
mas a natureza humana não é muito paciente.*

*Temos pressa em tudo, aí acontecem os atropelos do destino,
aquela situação que você mesmo provoca
por pura ansiedade de não aguardar o Tempo Certo.*

Mas alguém poderia dizer: qual é esse Tempo Certo?

Bom, basta observar os sinais...

*Quando alguma coisa está para acontecer ou chegar até sua vida,
pequenas manifestações do cotidiano enviarão sinais
indicando o caminho certo.*

*Pode ser a palavra de um amigo, um texto lido,
uma observação qualquer;*

*mas com certeza, o sincronismo se encarregará de colocar você
no lugar certo, na hora certa, no momento certo,
diante da situação ou da pessoa certa.*

*Basta você acreditar que
nada acontece "por acaso".*

Tente observar melhor o que está a sua volta.

*Com certeza alguns desses sinais já estão por perto,
e você nem os notou ainda.*

*Lembre-se que o universo sempre conspira a seu favor,
quando você possui um objetivo claro
e uma disponibilidade de crescimento interior.*

(Paulo Coelho)

A Deus

Por Sua infinita bondade, que tem me concedido amparo nas lutas do dia-a-dia. Pelos inúmeros companheiros de jornada que tem colocado em meu caminho, que parecem surgir “por acaso”, como mensageiros de Suas palavras de afeto, conforto, incentivo e esperança. Por Seus eternos ensinamentos de Amor, Paz e Sabedoria, que têm sido essenciais em minha caminhada evolutiva.

*“A benignidade do Senhor é grande para conosco,
e a Sua verdade dura para sempre” (Salmo 117: 2)*

*Aos meus pais, Akiko e Natio,
e aos meus irmãos, Adriana e Rogério*

Em meio a tantas palavras existentes no Universo, não há uma sequer capaz de expressar a minha imensa gratidão a vocês. Pelo imenso apoio moral e espiritual, que foram imprescindíveis para que eu pudesse chegar até aqui. Pelo constante incentivo e pelos ensinamentos de cada dia, tão valiosos para que eu me torne um ser humano melhor e capaz de trilhar os caminhos da Verdade. Acima de tudo, pelo infinito sentimento de amor que nos une, por além da eternidade, que tem sido a grande razão de minha felicidade interior.

*“Quando os ensinamentos do Mestre vibram entre quatro paredes de um templo doméstico, os pequeninos sacrifícios tecem a felicidade comum.”
(Chico Xavier)*

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim

Pela preciosa amizade, pela compreensão e pelo respeito às minhas dificuldades. Por todo o apoio, que sempre foi muito além do profissional, e essencial para o meu crescimento pessoal. Pelo exemplo de caráter e de conduta ética que prima pelo respeito ao Ser Humano como filho de Deus. Pela sensibilidade especial, que nos ensina a olhar para além do que as aparências podem nos mostrar.

" Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque tornar-se-á uma máquina utilizável, mas não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento, um senso prático do que é belo, do que é moralmente correto.

Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias, para determinar com exatidão seu lugar em relação a seus próximos e a sua comunidade."

(Albert Einstein)

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste
trabalho (processo 140462/2003-1).*

À Andréia C. K. K. Takara, pela amizade incondicional e eterna, pela constante presença com palavras de carinho, apoio e incentivo, e pelos inúmeros momentos de alegria compartilhados.

À Ana Carolina F. Motta, pela preciosa amizade, pela solidariedade e pelas sábias e iluminadas palavras de apoio nos mais diversos momentos.

À Renata Takeara, pela grande amizade sincera, construída ao longo de muitos anos, por pequenos momentos de convívio.

À Lilian S. C. Bernardes, pela amizade preciosa, pelas palavras de conforto e esperança, e pelo incentivo constante.

À Heloisa D. C. Francescato, pela solidariedade, compreensão e incentivo em minha jornada profissional.

À Gyselle C. Baccan, pela amizade e pelas reflexões, que me ajudaram a enxergar a vida por outros ângulos.

Ao Ricardo L. M. Sousa, pela amizade, pela paciência em ouvir e pelas sábias palavras de incentivo.

Ao Eduardo Ricci Junior, pela amizade preciosa, pelos momentos de riso compartilhados e pelo apoio constante.

Aos amigos do Batuíra, pela acolhida afetuosa, pelo apoio e companheirismo, e pelos iluminados ensinamentos e reflexões.

Aos “companheiros de jornada” do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP :

Alexandre Kanashiro, pela amizade preciosa, pelo apoio constante e muitas vezes silencioso, pelos momentos de reflexão filosófica, e pelo grande exemplo de solidariedade.

Denise P.S. Leitão, pela amizade incondicional e sincera, pelas palavras afetuosas de conforto, e pelo imprescindível apoio nos momentos mais difíceis da caminhada evolutiva.

Adriana B.P. Paschoalato, pela amizade sincera, pelo apoio e cooperação, e pelo belo exemplo de humildade, solidariedade e bom humor.

Livia M.C.S. Ambrosio, pela amizade verdadeira, generosidade e companheirismo, e pelos inesquecíveis momentos de reflexão filosófica.

Mirian R. Moreira, pela amizade, pelo incentivo constante, e pelos inúmeros momentos de aprendizado e crescimento compartilhados.

Ana Paula L. Librandi, pela amizade, pelo apoio constante e pelas reflexões, que tanto contribuíram para o meu aprendizado.

Elisa M.S. Russo-Carbolante, pela amizade, pela paciência em ouvir, e pela sinceridade em suas palavras de conforto e incentivo.

Eleni M.M. Marzocchi-Machado, pela amizade, pela cooperação, e pela valiosa contribuição para o meu aprendizado.

Fábio E. Mingatto, pela amizade, pela prontidão em ajudar e cooperar nos mais diversos momentos, e pelos inúmeros ensinamentos profissionais e pessoais.

Celma G. Duarte, pela amizade ímpar, pelas palavras de apoio, incentivo e esperança, e pelos inúmeros momentos de riso compartilhados.

Viviane K.S. Kawata, pela amizade, pela solidariedade e prontidão em ajudar.

As pós-graduandas Celene M.O.S. Alves, Daiani C.O. Andrade e Fabiana S. Paula, pela amizade e por ressaltarem a importância do espírito de cooperação para o crescimento de um grupo de pesquisa.

Os estagiários Andrea S.G. Figueiredo, Joel G. Souza e Tatiana S. Marasca, que imprimem uma alegria ímpar ao grupo de pesquisa, pela amizade e imprescindível cooperação.

Os pós-graduandos Acácio A. Pigoso, Anaisa F.C. Helena, Cássio B. Pontes, César R. Pestana, Cláudia S. Bitencourt, Clayton S. Freitas, Daniel J. Dorta, Fernando A.M. Souza, Laura M. Valdevite, Mateus F. Leite, Tiago Rodrigues, Wagner R. Sousa, pela agradável convivência.

Os estagiários Ana Lúcia C. Cunha, Ana Paula S. Oliveira, Carlos Eduardo Pulici, Cláudia M. Figueira, Daniela G. Pantalena, Edson L.N. Rios, Elaine A. Kaurvauti, Jennifer M.C. Yokoya, Larissa D. Figueiredo, Luis Eduardo F.A. Silva, Marina Biagioni, Sílvia A. Cardoso, Tais N. Chrysostomo, pela agradável convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP:

Maria Regina de P. Raphaeloski, pela amizade sincera, pelo apoio constante e incondicional, pelas inesquecíveis palavras de incentivo e esperança, e pelos inúmeros momentos de reflexão filosófica.

Ana Elisa C.S. Azzolini, pela amizade, pela prontidão em ajudar, pela imprescindível cooperação para a realização deste trabalho, pelos diversos momentos de crescimento e aprendizado pessoal e profissional compartilhados, e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ana Cristina M. Polizelo, pela amizade, pelo apoio e auxílio constantes, e pelos agradáveis momentos de convivência e aprendizado.

Jeda M.R. Prado, pela amizade, pelo apoio muitas vezes silencioso, e pelos agradáveis momentos de convivência e aprendizado.

Nadir Mazzucato, pela amizade sincera, pelo carinho maternal e apoio espiritual, demonstrado em pequenas e singelas atitudes.

Alcides S. Pereira, pela amizade, pelos momentos de aprendizado proporcionados, e pela importante colaboração para a realização deste trabalho.

Aos Professores: Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi, Dra. Carem Gledes Vargas Recchia, Dr. Carlos Curti e Dr. Augusto César Cropanese Sapdaro, pelos ensinamentos acadêmicos e lições de vida transmitidos, pela agradável convivência, e pelos momentos de riso e de reflexão compartilhados.

Ao Prof. Dr. Sérgio A. Uyemura, do laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP, pela amizade e cooperação, pelos diversos esclarecimentos prestados, e pela prontidão em ajudar.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP: Flávia Martinello, Frederico M. Soriani, Sheila Maria Soares, Taisa Magnani, Valéria G. Tudella e Vicente P. Martins, pela agradável convivência e pela prontidão em ajudar.

À Profa. Dra. Mônica J. Pupo, do Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP, pelo fornecimento das 3-fenilcumarinas, pelo imprescindível auxílio e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Oliveira, da Universidade Federal de Uberlândia, pela amizade, pela cooperação nas análises de microscopia eletrônica, pela prontidão em ajudar, e pelas frutíferas discussões no decorrer do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos H.T.P. Silva, do Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP, pela valiosa contribuição nos estudos de modelagem molecular.

Ao Prof. Dr. Bernardo Mantovani, e aos técnicos Silvana C. Silva e José Antônio da Silva, do Laboratório de Bioquímica da FMRP-USP, pela preciosa cooperação e pelas importantes discussões sobre os ensaios biológicos.

À Profa. Dra. Ivone de Carvalho, do Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP, pela importante contribuição na elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia H. Faccioli, do Laboratório de Imunologia da FCFRP-USP, pelos diversos esclarecimentos prestados, e pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Luis C. Lopes, do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP-USP, pela amizade, pelos inúmeros esclarecimentos prestados, e pela constante cooperação.

Ao Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos, do Laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP, pela agradável convivência e por estar sempre aberto a esclarecimentos dos mais diversos tipos.

Aos Funcionários da FCFRP-USP Cláudia C. Macedo, Cássio L. Rodrigues e Sonia A.C. Dreossi, pela prontidão em ajudar e pela agradável convivência.

As Funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FCFRP-USP Ana Lúcia T. Barbosa, Eleni A. Passos e Rosana F.L.S. Florêncio, pela paciência e pela imprescindível assistência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Funcionários do Biotério da FCFRP-USP e do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, pelo cuidado no tratamento dos animais.

Aos Funcionários da Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela simpatia, pela atenção e pela prontidão em ajudar.

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

Resumo

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 (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A formação de complexos antígeno-anticorpo ou imunocomplexos (ICs) na circulação e sua eliminação faz parte dos mecanismos de defesa imune humoral do ser humano. Em algumas patologias, como lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e vasculite auto-imune, ocorre um desequilíbrio nesse processo, que leva à deposição dos ICs nos tecidos e ao desencadeamento de uma reação inflamatória. Esta, por sua vez, envolve o recrutamento e ativação de neutrófilos, que têm importante participação na patogênese dessas doenças.

A ativação dos neutrófilos pelos ICs, via receptores para a porção Fc de IgG (FcγR) e receptores de complemento (CR), desencadeia diversas funções efetoras, tais como fagocitose, desgranulação e o metabolismo oxidativo, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas funções estão envolvidas na digestão dos ICs, na morte de microorganismos, e na regulação do processo inflamatório. Entretanto, nas doenças mediadas por ICs, os neutrófilos ativados liberam grandes quantidades de enzimas e EROs para o meio extracelular, contribuindo para a lesão dos tecidos do hospedeiro e a amplificação do processo inflamatório.

Neste trabalho foi avaliado o efeito modulatório de vinte derivados de 3-fenilcumarina nas funções de neutrófilos estimulados por ICs de ovalbumina (OVA) e IgG anti-OVA. Além disso, foi feita a investigação mecanismos de ação dessas substâncias e a análise da relação estrutura-atividade.

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos ativados por ICs foi medido por ensaio de quimioluminescência dependente de lucigenina ou de luminol (QLluc^{PMN} e QLlum^{PMN}, respectivamente). Observou-se que as 3-fenilcumarinas contendo o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí e o grupo substituinte 6,7-*orto*-diidroxí (**C13**) ou 6,7-*orto*-diacetoxí (**C13a**), bem como a 3-fenilcumarina 6,7,3',4'-tetraacetoxilada (**C24a**), apresentaram atividade inibitória maior que a quercetina (**QUER**) sobre a QLluc^{PMN} e a QLlum^{PMN}. Para as demais substâncias avaliadas, que foram tão ou menos ativas que a **QUER**, as características estruturais relacionadas à inibição da QLluc^{PMN} foram um pouco diferentes daquelas relacionadas à inibição da QLlum^{PMN}. Além disso, as 3-fenilcumarinas estudadas e a **QUER** não apresentaram efeito tóxico sobre os neutrófilos, avaliado pela liberação de lactato desidrogenase e pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, nas condições empregadas.

Para as três 3-fenilcumarinas que apresentaram maior efeito inibitório sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (**C13**, **C13a** e **C24a**), o aumento do tempo de pré-tratamento levou a uma tendência de redução do efeito inibitório da substância **C24a**, mas não influenciou na atividade biológica das substâncias **C13** e **C13a**. Essas três substâncias não interferiram na capacidade fagocítica das células, avaliada por microscopia eletrônica de transmissão.

Para todas as 3-fenilcumarinas foi avaliada também a capacidade antioxidante frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e o efeito inibitório dessas substâncias sobre a quimioluminescência produzida pela reação *horseradish peroxidase*-H₂O₂-luminol (QL^{HRP}). Foi observado que a **QUER** e as 3-fenilcumarinas contendo o grupo substituinte *orto*-diidroxí (**C13**, **C23**, **C24**) tiveram atividade antioxidante e inibiram a QL^{HRP}, mas suas análogas acetoxiladas (**C13a**, **C23a**, **C24a**), bem como as demais substâncias avaliadas, foram significativamente menos ativas nesses modelos experimentais não celulares.

O conjunto de resultados deste trabalho sugere que as atividades biológicas das 3-fenilcumarinas estudadas foram dependentes de suas estruturas químicas, e pequenas modificações nestas podem levar a alterações significativas na magnitude de seus efeitos biológicos. Além disso, tanto a lipofilicidade das substâncias quanto a sua capacidade antioxidante parecem ser relevantes para a modulação eficiente do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e da conseqüente lesão tecidual.

Palavras-chave: neutrófilos, imunocomplexos, cumarinas, relação estrutura-atividade, antioxidantes.

Abstract

KABEYA, L.M. **Study of the modulatory effect of 3-phenylcoumarin derivatives in the immune complex-stimulated neutrophil functions and analysis of the structure-activity relationship.** 2006. 192f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Formation and clearance of circulating antigen-antibody complexes or immune complexes (ICs) take part in the humoral immune defense mechanisms. In some diseases, as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and auto-immune vasculitis, an imbalance of this process occurs, leading to the ICs deposition within tissues and triggering an inflammatory reaction. The last one involves the recruitment and activation of neutrophils, which have an important role in the pathogenesis of such diseases.

Neutrophil activation by ICs, via receptors for the Fc portion of IgG (FcγR) and complement receptors (CR), triggers a sort of effector functions, such phagocytosis, degranulation and the oxidative metabolism, which produces reactive oxygen species (ROS). These functions are involved in the ICs digestion, microbial killing and the inflammatory process regulation. However, the activated neutrophils release large amounts of enzymes and ROS to the extracellular milieu, contributing to the tissue damage and amplification of the inflammatory process in the IC-mediated diseases.

In this work, we evaluated the modulatory effect of twenty 3-phenylcoumarin derivatives in the neutrophil functions stimulated by ICs of ovalbumin (OVA) and IgG anti-OVA. In addition, the mechanisms of action of these compounds were investigated, and the structure-activity relationship was analyzed.

The IC-activated neutrophil oxidative metabolism was measured by lucigenin- or luminol-dependent chemiluminescence assay (CLluc^{PMN} and CLlum^{PMN}, respectively). It was observed that the 3-phenylcoumarins bearing a 3',4'-methylenedioxy and the 6,7-*orto*-dihydroxy (**C13**) or the 6,7-*orto*-diacetoxy (**C13a**) group, as well as the 6,7,3',4'-tetraacetoxy 3-phenylcoumarin (**C24a**), inhibited CLluc^{PMN} and CLlum^{PMN} more than quercetin (**QUER**). Regarding the other evaluated compounds, whose inhibitory effects were similar to or lower than **QUER**, the structural features related to the CLluc^{PMN} inhibition were different from those related to the CLlum^{PMN} inhibition. Moreover, the studied 3-phenylcoumarins and **QUER** had no toxic effects on neutrophils, as evaluated by lactate dehydrogenase release and Trypan Blue exclusion, under the assessed conditions.

With respect to the three 3-phenylcoumarins that had the highest inhibitory effects on the neutrophil oxidative metabolism (**C13**, **C13a** and **C24a**), the increase of

the cell pre-treatment period showed a tendency to decrease the inhibitory ability of compound **C24a**, but did not influence the biological activity of compounds **C13** and **C13a**. These three compounds did not interfere in the neutrophil phagocytic ability, as evaluated by transmission electron microscopy.

The antioxidant activity against the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical and the inhibitory effect in the chemiluminescence generated by the *horseradish peroxidase*-H₂O₂-luminol reaction (CL^{HRP}) were evaluated for all 3-phenylcoumarins. It was found that **QUER** and those 3-phenylcoumarins bearing the *orto*-dihydroxy group (**C13**, **C23**, **C24**) had antioxidant activity and inhibited the CL^{HRP}. However, their acetoxyated analogues (**C13a**, **C23a**, **C24a**) and the other evaluated compounds were significantly less active on these cell-free experimental models.

Taken together, the results of the present work suggest that the biological activities of the 3-phenylcoumarins here investigated were dependent on their chemical structures, and small changes on the molecule can lead to significant changes on the magnitude of their biological effects. Moreover, both lipophilicity and antioxidant capacity of these compounds seem to be relevant to an efficient modulation of the neutrophil functions and the consequent tissue damage.

Key words: neutrophils, immune complexes, coumarins, structure-activity relationship, antioxidants.

Lista de abreviaturas

ANCA	anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilo
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BPI	proteína promotora de permeabilidade bacteriana
C3b, C3bi, C5a	fragmentos de ativação do sistema complemento
CD	<i>cluster</i> de diferenciação
CI ₅₀	concentração que inibe 50% da resposta biológica
CoA	coenzima A
c.p.m.	fótons contados por minuto (<i>counted photons per minute</i>)
CR	receptor de complemento
CR1, CR3	receptores de complemento tipo 1 e 3
CR ₅₀	concentração que promove 50% de redução do DPPH
DAF	fator acelerador de decaimento
DCFH	diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EGFR	receptor para fator de crescimento epidérmico
EROs	espécies reativas de oxigênio
F(ab') ₂	fragmentos de ligação ao antígeno da molécula de anticorpo
Fc	fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
FcγR	receptore para porção Fc de IgG
FcγRIIA, FcγRIIIB	isoformas de receptores FcγR
gp91 ^{phox}	glicoproteína de 91 KDa componente do complexo da NADPH oxidase

G-CSF	fator estimulante de colônia de granulócito
GRO α	produto gênico relacionado a crescimento
GTP	trifosfato de guanosina
hCAP-18	peptídeo catiônico antimicrobiano 18 humano
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC	imunocomplexo
IC F(ab') ₂ -OVA	imunocomplexo de OVA e fragmento F(ab') ₂ de IgG anti-OVA
IC F(ab') ₂ -OVA-SC	imunocomplexo de OVA e fragmento F(ab') ₂ de IgG anti-OVA, opsonizado com soro de coelho
IC IgG-OVA	imunocomplexo de OVA e IgG anti-OVA
IC IgG-OVA-SC	imunocomplexo de OVA e IgG anti-OVA, opsonizado com soro de coelho
ICAM	molécula de adesão intracelular
IFN- γ	interferon gamma
IgG	imunoglobulina da classe G
IL	interleucina
IP-10	proteína 10 indutível pelo interferon gamma
I-TAC	quimioatraente de células T indutível pelo interferon gamma
LDH	lactato desidrogenase
LTB ₄	leucotrieno tipo B ₄
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos
MIG	monocina indutível pelo interferon gamma
MIP-1 α , MIP-1 β	proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 α e 1 β
M.M.	massa molecular
MMP8, MMP9, MMP25	metaloproteinase de matriz tipo 8, 9 e 25
MPO	mieloperoxidase
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NCF	fator citosólico de neutrófilo
<i>n</i> -fMLP	<i>n</i> -formil-metionil-leucil-fenilalanina
OVA	ovalbumina
p22 ^{phox} , p40 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox}	proteínas de 22, 40, 47 e 67 KDa, componentes do complexo da NADPH oxidase
PAR-4	receptor do tipo 4 ativado por protease
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PECAM-1	molécula de adesão endotélio-plaquetário tipo 1
phox	oxidase de fagócito (<i>phagocyte oxidase</i>)
PMA	acetato de miristoilforbol
p/v	peso/volume
QL ^{HRP}	quimioluminescência produzida pela reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol
QLluc ^{PMN}	quimioluminescência dependente de lucigenina
QLlum ^{PMN}	quimioluminescência dependente de luminol
QUER	quercetina
R _F	fator de retardamento
SC	soro de coelho
S/D	sem diluir; não diluído
SDS	dodecil sulfato de sódio
SLPI	inibidor de protease secretória de leucócitos
SOD	superóxido dismutase
TGF- α	fator de transformação e crescimento tipo alfa
TNF- α	fator de necrose tumoral tipo alfa
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
v/v	volume/volume
Ziops	zimosan opsonizado

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. Neutrófilos.....	30
1.1.1. Características morfológicas.....	30
1.1.2. Funções fisiológicas.....	32
1.1.2.1. Participação na resposta inflamatória.....	32
1.1.2.2. Produção de mediadores inflamatórios.....	34
1.1.2.3. Desgranulação.....	36
1.1.2.4. Fagocitose.....	41
1.1.2.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	44
1.2. Doenças mediadas por imunocomplexos (ICs).....	50
1.2.1. Aspectos fisiopatológicos.....	50
1.2.2. Participação de neutrófilos.....	54
1.3. Cumarinas.....	56
1.3.1. Biogênese e ocorrência.....	56
1.3.2. Atividades biológicas.....	58
1.4. 3 – Fenilcumarinas.....	61
1.5. Flavonóides.....	63
1.5.1. Biogênese e ocorrência.....	63
1.5.2. Quercetina.....	64
1.6. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais.....	66
2. OBJETIVOS.....	68
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.1. Abordagem experimental.....	71
3.2. Sustâncias estudadas.....	72
3.2.1. 3 – Fenilcumarinas.....	72
3.2.2. Quercetina.....	75
3.2.3. Avaliação da solubilidade das 3 – fenilcumarinas em meio aquoso.....	75
3.3. Animais.....	77
3.4. Isolamento de neutrófilos.....	77
3.5. Obtenção de soro normal.....	78
3.6. Obtenção, purificação e caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti – OVA.....	78

3.6.1. Obtenção do soro imune rico em IgG anti – OVA.....	79
3.6.2. Purificação do soro imune para obtenção de IgG total	79
3.6.3. Caracterização da preparação de IgG total rica em IgG anti – OVA.....	82
3.6.3.1. Análise eletroforética da fração IgG total do soro imune	82
3.6.3.2. Determinação do ponto de equivalência da reação antígeno – anticorpo	84
3.7. Preparo de fragmentos F(ab') ₂ a partir de moléculas de IgG íntegra.....	87
3.8. Preparo de ICs	87
3.9. Opsonização dos ICs	88
3.10. Ensaio em sistemas celulares.....	88
3.10.1. Padronização de ensaio para avaliação da atividade do complexo enzimático de NADPH oxidase de neutrófilos	88
3.10.2. Avaliação da toxicidade das 3 – fenilcumarinas sobre neutrófilos.....	91
3.10.3. Avaliação da atividade biológica das 3 – fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR.....	92
3.10.4. Avaliação da atividade biológica das 3 – fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR, em função do tempo de pré-tratamento	96
3.10.5. Avaliação da atividade biológica das 3 – fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR e/ou CR.....	96
3.10.6. Avaliação da atividade biológica das 3 – fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre a fagocitose de ICs.....	99
3.11. Ensaio em sistemas não – celulares.....	100
3.11.1. Avaliação da atividade antioxidante das 3 – fenilcumarinas frente ao radical livre DPPH.....	100
3.11.2. Avaliação da atividade antioxidante das 3 – fenilcumarinas empregando a reação HRP–H ₂ O ₂ –luminol.....	101
3.12. Avaliação da interação das 3 – fenilcumarinas com a HRP por <i>docking</i>	103
3.13. Análise dos dados.....	104
4. RESULTADOS.....	105
4.1. Ensaio em modelos experimentais celulares, empregando neutrófilos de coelho	106
4.1.1. Avaliação da toxicidade das 3 – fenilcumarinas sobre neutrófilos	106
4.1.2. Efeito das 3 – fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR.....	108

4.1.2.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$	108
4.1.2.2. Avaliação da atividade biológica em função da concentração.....	112
4.1.2.3. Análise qualitativa da relação estrutura – atividade.....	118
4.1.2.3.1. Características estruturais das 3 – fenilcumarinas relacionadas à inibição de QLuc^{PMN}	118
4.1.2.3.2. Características estruturais das 3 – fenilcumarinas relacionadas à inibição de QLum^{PMN}	122
4.1.3. Efeito das 3 – fenilcumarinas C13 , C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores $\text{Fc}\gamma\text{R}$, em função do tempo de pré-tratamento.....	125
4.1.4. Efeito das 3 – fenilcumarinas C13 , C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores $\text{Fc}\gamma\text{R}$ e/ou CR	127
4.1.5. Efeito das 3 – fenilcumarinas C13 , C13a e C24a sobre a fagocitose de ICs por neutrófilos, mediada por receptores $\text{Fc}\gamma\text{R}$	130
4.2. Ensaio em sistemas não – celulares.....	132
4.2.1. Avaliação da atividade antioxidante das 3 – fenilcumarinas frente ao radical livre DPPH.....	132
4.2.1.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$	132
4.2.1.2. Avaliação da porcentagem de redução do DPPH em função da concentração das 3 – fenilcumarinas.....	135
4.2.1.3. Análise qualitativa da relação estrutura – atividade	137
4.2.2. Avaliação da atividade antioxidante das 3 – fenilcumarinas, empregando a reação $\text{HRP} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{luminol}$	138
4.2.2.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$	138
4.2.2.2. Atividade biológica das 3 – fenilcumarinas em função da concentração.....	141
4.2.2.3. Análise qualitativa da relação estrutura – atividade	143
4.3. Avaliação da interação entre as 3 – fenilcumarinas e a HRP por <i>docking</i>	144
5. DISCUSSÃO	147
5.1. Efeito modulatório das 3 – fenilcumarinas nos modelos experimentais celulares.....	148
5.2. Efeito modulatório das 3 – fenilcumarinas nos modelos experimentais não celulares	157
5.3. Considerações finais.....	162
6. CONCLUSÃO	164
REFERÊNCIAS	167
ANEXO	191

1. *Introdução*

1.1. Neutrófilos

1.1.1. Características morfológicas

O sangue periférico é constituído por três diferentes linhagens celulares: glóbulos brancos ou leucócitos; glóbulos vermelhos, eritrócitos ou hemácias; plaquetas ou trombócitos. Os leucócitos formam o grupo mais heterogêneo de células do sangue, tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico, e desempenham papel de defesa do organismo, sendo que cada subtipo leucocitário detém funções bastante específicas e distintas entre si, que, em conjunto, estruturam o sistema imunológico (ZAGO; FALCÃO, 2004).

Os leucócitos são agrupados em mononucleares e polimorfonucleares. Os primeiros incluem os linfócitos, plasmócitos e os monócitos, cuja característica peculiar é a de possuir um núcleo único e uniforme. Os últimos, também chamados de granulócitos pela presença de granulação citoplasmática, incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e possuem um núcleo multiforme e segmentado (BAINTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971; JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992).

Os leucócitos polimorfonucleares foram descobertos por Paul Erlich, quando as técnicas de fixação e coloração celular possibilitaram a identificação do núcleo lobulado e da presença dos grânulos citoplasmáticos (ERLICH; LAZARUS, 1900 *apud* BORREGAARD; COWLAND, 1997). Os granulócitos neutrófilos, ou simplesmente neutrófilos são assim chamados pela sua tonalidade neutra nas colorações de Romanowsky, enquanto os eosinófilos possuem grande afeição pela eosina e os basófilos são facilmente identificados

pela presença de grânulos citoplasmáticos grandes e de cor escura (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Os neutrófilos representam cerca de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico de adultos. Os neutrófilos circulantes são células esféricas de 10 a 20 μm de diâmetro, com núcleo segmentado constituído de cromatina purpúrea escura e densa, com 3 a 5 lóbulos interligados por um tênue filamento de cromatina, muitas vezes invisível na microscopia convencional. O citoplasma é abundante, contendo fina granulação específica, a qual é formada durante o processo de maturação da célula (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; RAVEL, 1997) (Figura 1.1).

Os neutrófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, sendo liberados na sua forma madura para o sangue periférico, onde tem uma média de vida em circulação bastante curta, de 6 a 7 horas. O local de destruição final dos neutrófilos não é bem conhecido, mas são encontrados na saliva, no trato gastrointestinal e também podem ser removidos da circulação pelo fígado, pulmões e baço (BAINTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971; JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992; FALCÃO, 2004).

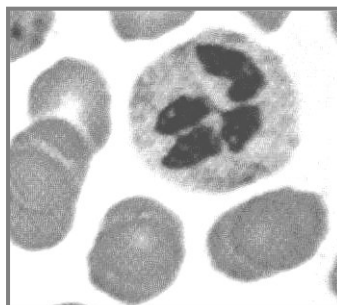


Figura 1.1. Neutrófilo com morfologia característica, apresentando núcleo multilobulado e granulação citoplasmática. Adaptado de Lekstrom-Himes e Gallin (2000).

1.1.2. Funções fisiológicas

1.1.2.1. Participação na resposta inflamatória

A inflamação é definida como um processo fisiológico através do qual os tecidos vascularizados respondem a lesões teciduais de diferentes naturezas, provocadas por traumas, infecções, isquemia ou reações auto-imunes, através da participação de componentes do sistema imune (SHERDWOOD; TOLUIVER-KINSKY, 2004). O recrutamento de leucócitos sanguíneos para o local da lesão é um dos primeiros eventos da resposta inflamatória, sendo mediado por agentes exógenos como endotoxinas bacterianas e produtos virais, e agentes endógenos, como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e componentes do sistema complemento (GOUWY et al., 2005).

Dentre os leucócitos, os neutrófilos são os primeiros componentes celulares do sistema imune que chegam nos sítios inflamatórios, sendo, por esta razão, considerados a primeira linha de defesa do organismo (LEHRER et al., 1988; QUINN; GAUSS, 2004; HENSON, 2005). Essas células desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro durante a resposta inflamatória aguda em decorrência da sua capacidade de envolver e destruir uma variedade de patógenos que ocasionalmente penetram nas barreiras físicas do organismo (ALLEN, 2003; LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; QUINN; GAUSS, 2004).

O processo de migração dos neutrófilos do sangue para os tecidos envolve uma seqüência de passos conhecidos: contato, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia (LEY, 2002). Inicialmente, o processo de rolamento é mediado por moléculas da família das selectinas, enquanto que o processo de adesão é mediado por moléculas de alta afinidade de ligação, como as integrinas

(CD11/CD18) presentes nos leucócitos, e as moléculas de adesão intracelular (ICAM) expressas pelas células endoteliais. Finalmente, o evento conhecido como diapedese é mediado por moléculas de adesão endotélio-plaquetário do tipo 1 (PECAM-1) (LIU et al., 2004; ZAGO; FALCÃO, 2004).

Uma vez no local da lesão, os neutrófilos atuam na defesa do organismo através de mecanismos dependentes de oxigênio, que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e de mecanismos independentes de oxigênio, que compreendem a fagocitose, desgranulação, produção de mediadores anti- e pró-inflamatórios (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; QUINN; GAUSS, 2004; SEGAL, 2005). Essas células podem ainda atuar como apresentadoras de antígenos para linfócitos T (POTTER; HARDING, 2001).

Algumas horas após o influxo de leucócitos para o local da inflamação, o processo de resolução natural da inflamação se inicia. De modo geral, este processo envolve as seguintes etapas: (a) a remoção do estímulo inicial; (b) decréscimo na produção de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, que atraem novos leucócitos para o local da lesão; (c) aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, como as resolvinas e as protectinas, que induzem a apoptose de neutrófilos, e as lipoxinas, que retardam a entrada de novos neutrófilos para o sítio inflamatório, reduzem a permeabilidade vascular e ativam os macrófagos para ingerir e eliminar neutrófilos apoptóticos; (d) remoção das células inflamatórias e debris celulares para permitir o reparo final. Este processo termina com a partida dos macrófagos via sistema linfático (HENSON, 2005; SERHAN; SAVILL, 2005).

Em circunstâncias normais, a estrutura e a função tecidual são restauradas após uma resposta inflamatória. Entretanto, se o delicado balanço entre inflamação e resolução se torna desregulado, a inflamação pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas como artrite, doença inflamatória intestinal e asma. Nesses casos, onde a lesão geralmente é extensa ou persistente, os tecidos lesados são substituídos por material fibroso, o que pode ocasionar a perda da função tecidual (BIASI et al., 2003; HENSON, 2005; SERHAN; SAVILL, 2005).

1.1.2.2. Produção de mediadores inflamatórios

Os neutrófilos são usualmente conhecidos como a população de leucócitos envolvida em respostas inflamatórias agudas, agindo como a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores (QUINN; GAUSS, 2004; HENSON, 2005). Descobertas recentes, entretanto, têm mostrado que os neutrófilos sintetizam citocinas e quimiocinas, que desempenham papéis fundamentais na coordenação das respostas do sistema imune, no desenvolvimento de linfócitos B e T, e na modulação da angiogênese (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000; KASAMA et al., 2005; NATHAN, 2006).

Assim como os monócitos, os neutrófilos são capazes de sintetizar e secretar o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral tipo alfa ($TNF-\alpha$), interleucinas (IL) IL-12, IL-1 α , IL-1 β], e quimiocinas, como IL-8, IP-10 [proteína 10 indutível pelo interferon gamma ($IFN\gamma$)], GRO α (produto gênico relacionado a crescimento),

MIG (monocina indutível pelo IFN γ), MIP-1 α e MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófagos) (STRIETER et al., 1990; BAZZONI et al., 1991; KASAMA et al., 1994; GASPERINI et al., 1995; CASSATELLA et al., 1997; SCAPINI et al., 2000).

A capacidade dos neutrófilos de expressar os genes para I-TAC (quimioatraente de células T indutível pelo IFN γ) e MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos tipo 1) foram descritas, mas ainda não há informação sobre a sua secreção. (GASPERINI et al., 1999; KASAMA et al., 2005; GOUWY et al., 2005).

Devido ao fato de que estes mediadores são primariamente quimiotáticos para neutrófilos, monócitos, células dendríticas imaturas e linfócitos T, é provável que o neutrófilo desempenhe importante papel no recrutamento de tipos distintos de leucócitos para o tecido inflamado (SCAPINI et al., 2000; GOUWY et al., 2005). Por exemplo, os neutrófilos não são apenas os produtores, mas também os alvos primários para a IL-8, respondendo a este mediador por quimiotaxia, desgranulação, produção de EROs, aumento da expressão de moléculas de adesão e aderência aumentada a células endoteliais (WILLEMS et al., 1989; BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1994). Além disso, a IL-8 é também fator quimiotático para basófilos e linfócitos T, embora muito menos potente do que para neutrófilos, e é descrito como fator angiogênico (ROLLINS, 1997; HOFFMANN et al., 2002). Em relação a MIP-1 α e MIP-1 β , estas quimiocinas agem como potentes fatores ativadores e quimiotáticos para monócitos, macrófagos, células *natural killer*, células dendríticas imaturas e células T *helper* 1 (SIVEKE; HAMMAN, 1998; GOUWY et al., 2005).

A secreção de citocinas e quimiocinas por neutrófilos ativados, regulada por citocinas imuno-regulatórias, tais como IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13, está geralmente aumentada durante certas condições patológicas, como artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e infecções micobacterianas (BILLIAU, 1996; LUSTER, 1998; GOUWY et al., 2005).

1.1.2.3. Desgranulação

Há mais de um século, o Dr. Eli Metchnikoff observou que neutrófilos ingeriam partículas bacterianas e que, coincidentemente com o processo de desgranulação, as bactérias paravam de se dividir (METCHNIKOFF, 1968 *apud* LEVY, 2004). Ao longo dos anos seguintes, evidências científicas sugeriam que os leucócitos matavam as bactérias através de mecanismos dependentes e independentes de oxigênio.

Na década de 1930, foi observado que os neutrófilos sofrem um aumento no metabolismo respiratório, evento que foi relacionado com a ativação da enzima oxidase de fagócitos, hoje conhecida como complexo da NADPH oxidase (BALDRIDGE; GERARD, 1933; BABIOR, 1999; ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003). Entretanto, uma grande variedade de agentes independentes de oxigênio, com atividade microbicida direta, foi descoberta antes e depois da identificação dessa enzima. Na década de 1930, Alexander Flemming descreveu a lisozima (HARE, 1983; LEVY, 2004), encontrada em fagócitos. Hirsch (1956) e Zeya e Spitznagel (1963) examinaram a atividade microbicida de extratos brutos de neutrófilos e iniciaram a caracterização de alguns polipeptídeos catiônicos

antimicrobianos. Com o advento de novas técnicas cromatográficas, vários grupos nas décadas de 1970 e 1980 relataram a purificação de novas proteínas e peptídeos antimicrobianos derivados dos grânulos de leucócitos (revisado por LEVY, 2004).

Os grânulos intracelulares dos neutrófilos são atualmente classificados em primários (ou azurófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias. Os diferentes tipos de grânulos compartilham algumas proteínas, como a lisozima, enquanto que outras são encontradas em apenas um dos tipos de grânulos, servindo como marcadores específicos, como mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, gelatinase e albumina (BORREGAARD; COWLAND, 1997; GUDMUNDSSON; AGERBERTH, 1999; MOLLINEDO; BORREGAARD; BOXER, 1999). Os principais componentes de cada tipo de grânulo são mostrados na Tabela 1.1.

Os componentes dos grânulos estão relacionados à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos, uma vez que a sua matriz é rica em enzimas e peptídeos com atividade microbicida, e as suas membranas são os principais reservatórios do flavocitocromo b_{558} ($gp91^{phox}/p22^{phox}$), um componente essencial da NADPH oxidase, e também de receptores de membrana dos neutrófilos (BORREGAARD; COWLAND, 1997; ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003). Conforme a membrana dos grânulos se funde com a membrana plasmática, as proteínas presentes nas membranas dos grânulos translocam para a superfície da membrana plasmática da célula e fornecem novos receptores e outras proteínas funcionais (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

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

Grânulos primários	Grânulos secundários	Grânulos terciários	Vesículas secretórias
mieloperoxidase	lactoferrina	gelatinase	albumina
defensinas	lisozima	lisozima	tetranectina
lisozima	histaminase	acetiltransferase	citocromo b ₅₅₈
fosfatase ácida	colagenase	β 2-microglobulina	fosfatase alcalina
β -glucuronidase	heparanase	citocromo b ₅₅₈	CR1
esterase	hCAP-18	CD11b	CD11b
catepsinas	citocromo b ₅₅₈	receptor para fMLP	receptor para fMLP
elastase	CD11b		CD14
proteínase-3	receptores para		CD16
sialidase	TNF- α		DAF
α -manosidase	laminina		
α 1-antitripsina	vitronectina		
CD63	fibronectina		
CD68	fMLP		

(a) Fontes: Borregaard e Cowland (1997); Gudmundsson e Agerberth (1999); Mollinedo, Borregaard e Boxer (1999); Zago e Falcão (2004). CD: *cluster* de diferenciação; CR: receptor de complemento; DAF: fator acelerador de decaimento; fMLP: *n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina; hCAP-18: peptídeo catiônico antimicrobiano 18 humano; TNF- α : fator de necrose tumoral tipo alfa.

O primeiro tipo de grânulo a ser liberado é a vesícula secretória. Durante o processo de rolagem do neutrófilo sobre o endotélio, a membrana da vesícula secretória funde-se à membrana plasmática, levando ao aumento da expressão da β ₂-integrina Mac-1 (α _M β ₂, CD11b/CD18) na membrana do neutrófilo, o que contribui para a adesão firme deste à célula endotelial (BORREGAARD et al., 1990). Na seqüência, são liberados os grânulos secundários e terciários, que são ricos em enzimas que degradam estruturas teciduais como laminina, colágeno,

proteoglicanas e fibronectina, facilitando o processo de migração dos neutrófilos para o local da inflamação. Dentre estas enzimas destacam-se as metaloproteinases de matriz (MMP8, MMP9 e MMP25), colagenase e gelatinase. Conforme a concentração de agentes quimiotáticos aumenta, os próximos a serem liberados são os grânulos primários, ricos em defensinas e MPO. Esta última converte o H_2O_2 em potentes agentes antimicrobianos, como HOCl, HOBr e HOI (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; NATHAN, 2006).

Além da função microbicida, as enzimas e os peptídeos contidos nos grânulos de neutrófilos também desempenham uma variedade de funções regulatórias em processos inflamatórios (GUDMUNDSSON; AGERBERTH, 1999; LEVY, 2004; WIEDOW; MEYER-HOFFERT, 2005). Por exemplo, as α -defensinas, pequenas proteínas ricas em arginina e cisteína, atuam como fatores quimiotáticos e estimuladores da liberação de IL-8 por células T, contribuindo para o recrutamento células inflamatórias (YANG et al., 2000; YANG; CHERTOV; OPPENHEIM, 2001). Essas proteínas participam também na fase de resolução do processo inflamatório, estimulando a mitogênese de fibroblastos para o reparo tecidual e a apoptose de células inflamatórias (LEHRER; LICHTENSTEIN; GANZ, 1993; ANDREU; RIVAS, 1998).

A proteinase-3, contida nos grânulos primários, converte os precursores inativos de TNF- α , IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas (ROBACHE-GALLEA et al., 1995; SUGAWARA et al., 2001; WIEDOW; MEYER-HOFFERT, 2005). Além disso, essa enzima converte o hCAP-18 (peptídeo catiônico antimicrobiano 18 humano), armazenado como pró-forma nos grânulos

secundários dos neutrófilos, em sua forma ativa, o peptídeo linear catiônico LL-37. Esse peptídeo, além de antimicrobiano, é também quimioatraente para neutrófilos, monócitos e células T do sangue periférico humano via interações com o receptor para *n*-fMLP (*n*-formil-metionil-leucil-fenilalanina), demonstrou atividade angiogênica e parece estar envolvido na cicatrização de lesões (GUDMUNDSSON; AGERBERTH, 1999; YANG; CHERTOV; OPPENHEIM, 2001; SCOTT et al., 2002; KOCZULLA et al., 2003; LEVY, 2004).

A catepsina G parece cooperar com a trombina na ativação do receptor tipo 4 ativado por protease (PAR-4), iniciando a agregação plaquetária (SAMBRANO et al., 2000). A elastase cliva a pro-TGF- α (fator de transformação e crescimento tipo alfa) ligada à membrana e libera a sua forma ativa solúvel, que por sua vez, liga-se ao EGFR (receptor para fator de crescimento epidérmico), estimulando a proliferação celular de queratinócitos (MEYER-HOFFERT; WINGERTSZAHN; WIEDOW, 2004). Além disso, a elastase degrada o G-CSF (fator estimulante de colônia de granulócito), regulando a granulopoiese, e se liga ao receptor de complemento (CR) do tipo 3 (CR3) revertendo a adesão leucocitária (CAI; WRIGHT, 1996; EL OURIAGHLI, 2003).

A lactoferrina, por meio do seu domínio lactoferricina N-terminal, aumenta a atividade fagocítica de neutrófilos, aparentemente via mecanismos opsônicos, e também modula a liberação de citocinas, aumenta a liberação de IL-6 e TNF- α por células mononucleares de sangue periférico e inibe a liberação de IL-1 e IL-2. (ADAMIK et al., 1998; MIYAUCHI et al., 1998; CACCAVO et al., 2002).

1.1.2.4. Fagocitose

Os fagócitos, considerados os principais componentes celulares do sistema imune inato, desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro durante a resposta inflamatória aguda, em decorrência da sua capacidade de envolver e destruir uma variedade de patógenos que ocasionalmente penetram nas barreiras físicas do organismo (QUINN; GAUSS, 2004). A função da fagocitose na defesa do hospedeiro foi descoberta por Elie Metchnikoff no final do século dezenove, e está descrita em seu trabalho publicado em 1883 (BABIOR, 2000a).

A fagocitose pode ser dividida em quatro etapas sucessivas: adesão entre o neutrófilo e o antígeno, ingestão, desgranulação, digestão do antígeno ingerido. A fagocitose de partículas, tais como microrganismos e imunocomplexos, requer a reorganização do citoesqueleto na região da membrana plasmática que entra em contato com a partícula. A mobilização dos filamentos de F-actina nessa região é iniciada por sinais que surgem da interação de receptores promotores de fagocitose na superfície da célula com ligantes na superfície da partícula (ALLISON; DAVIES; PETRIS, 1971; GREENBERG, 1995; ADEREN; UNDERHILL, 1999).

A adesão dos neutrófilos aos microrganismos é facilitada quando os últimos estão recobertos por anticorpos, proteínas do sistema complemento ou outros fatores séricos para os quais o neutrófilo dispõe de receptores específicos, processo denominado opsonização. Os receptores para opsoninas melhor caracterizados são os receptores Fc γ Rs [receptores para a porção Fc (fragmento cristalizável) de imunoglobulina da classe G (IgG)] e os receptores

para os componentes C3b e C3bi do sistema complemento, CR1 e CR3, respectivamente. Os neutrófilos podem também interagir diretamente com os microrganismos, por meio do reconhecimento de determinantes antigênicos expressos na superfície desses alvos. (GREENBERG, 1995; BROWN, 1995; LÖFGREN et al., 1999; TJELLE; LOVDAL; BERG, 2000).

Quando o neutrófilo adere à bactéria ou outros detritos, os pseudópodos os envolvem e englobam em vacúolos delimitados pelo segmento de membrana invaginado, denominado fagossomas. O conteúdo dos grânulos dos neutrófilos pode ser descarregado no interior dos fagossomas ou para o meio extracelular (exocitose). Em conjunto com esse processo, ocorre a geração de EROs, com grande potencial microbicida (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Dois tipos de receptores Fc γ R são expressos em neutrófilos humanos, Fc γ RIIA (CD32) e a forma de Fc γ RIII ligada por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (CD16, Fc γ RIIIB) (LÖFGREN et al., 1999; RAVETCH; BOLLAND, 2001; SONDERMANN; KAISER; JACOB, 2001). Embora não possua a região transmembrana e a citoplasmática, a ativação de Fc γ RIIIB em neutrófilos induz a liberação intracelular de cálcio, polimerização de F-actina e a produção de EROs (RAVETCH; BOLLAND, 2001). A ligação de Fc γ RIIA leva à fosforilação de tirosinas de diversas proteínas, incluindo a fosfolipase C γ 1 e p72^{syk}. Esta última é essencial para a fagocitose mediada por Fc em macrófagos e monócitos (DAËRON, 1997; LÖFGREN et al., 1999).

Acreditava-se que a interação devida ao CR não levava à ingestão do eritrócito opsonizado, e que somente a interação da molécula de IgG ligada à

partícula com o seu sítio receptor no neutrófilo era necessária para induzir o mecanismo de fagocitose (MANTOVANI, 1975). Hoje sabe-se que existem vários tipos de receptores CR expressos na membrana dos neutrófilos, com funções distintas, sendo CR1 e CR3 os mais relevantes quando se refere à fagocitose (SENGELØV, 1995).

Os receptores CR3 pertencem à família das β -2 integrinas, consistindo de 3 heterodímeros não-covalentemente ligados (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18). Todas essas integrinas são expressas em neutrófilos, sendo CD11b/CD18 a mais abundante (LÖFGREN et al., 1999). A ativação específica de CR3 induz atividade da fosfolipase D, polimerização de actina e produção intracelular de EROs. O CR3 interage com Fc γ RIII, acentuando a sinalização interna mediada por esses receptores (ZHOU; BROWN, 1994; SENDELØV, 1995).

Os receptores CR1 presentes em neutrófilos são responsáveis pela aderência de partículas revestidas por C3b, sem iniciar a fagocitose. Por outro lado, a ativação simultânea de CR1 e Fc γ R, por partículas revestidas por C3b e IgG, leva ao aumento da liberação intracelular de cálcio e da fagocitose, quando comparada a esses eventos mediados apenas por Fc γ R (ERNST; ROSALES; ZIMMERLI, 1995; KIMBERLY; SALMON; EDBERG, 1995). De modo semelhante, CR1 e CR3 cooperam no englobamento de eritrócitos revestidos por C3b, onde CR1 medeia a adesão inicial e CR3 é responsável pela sinalização celular que leva à fagocitose (SENGELØV, 1995).

A ativação de neutrófilos via receptores Fc γ R, em cooperação ou não com CR promove ainda a desgranulação, a ativação do metabolismo do ácido

araquidônico, produção de mediadores lipídicos, como o leucotrieno B₄, indução da síntese e liberação de citocinas, a ativação do metabolismo oxidativo, e aumento da expressão de enzimas envolvidas em processos inflamatórios, como a ciclooxigenase e a óxido nítrico sintase (LUCISANO; MANTOVANI, 1984, 1988; DAËRON, 1997; ALONSO et al., 1998; MARZOCCHI-MACHADO et al., 2002; JANCAR; CRESPO, 2005).

1.1.2.5. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O processo de fagocitose é acompanhado de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado "burst", surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa. Essa função celular é caracterizada pelo aumento do consumo de oxigênio e de trifosfato de adenosina (ATP), do aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da produção de grande quantidade de EROs (CHEUNG; ARCHIBALD; ROBINSON, 1983; JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992; ROSEN et al., 1995; BABIOR, 1999). Essas EROs são potentes agentes oxidantes que atuam em conjunto com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os antígenos fagocitados.

A explosão respiratória pode ser desencadeada quando as células fagocíticas são estimuladas por ionóforos, complexos imunes, partículas antigênicas opsonizadas (zimosan, látex), acetato de miristoilforbol (PMA) e por alguns mediadores do processo inflamatório, como ácido araquidônico, TNF- α , *n*-fMLP, C5a, leucotrieno tipo B₄ (LTB₄) (BROWN, 1995; SELVACITI et al.,

2006). Esse processo inicia-se com a formação do complexo da NADPH oxidase, que catalisa a produção de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a partir do O_2 dissolvido no meio, sendo, portanto caracterizado pelo aumento do consumo de O_2 . O radical superóxido produzido é então convertido a H_2O_2 , que, por sua vez, gera outras EROs ($HOCl$, 1O_2 , HO^{\bullet}), por meio de reações químicas e enzimáticas (BABIOR, 1999). As células fagocíticas geram as EROs utilizando basicamente quatro grupos de enzimas: o complexo da NADPH oxidase, a superóxido dismutase (SOD), a MPO e as óxido nítrico sintases NOS (HALLIWELL, 1999; BABIOR, 2000a) (Figura 1.2).

O aumento do consumo de O_2 pelos neutrófilos durante a fagocitose foi descrito pela primeira vez por Baldrige e Gerard (1933) (BABIOR, 2000a). Investigações dos mecanismos bioquímicos envolvidos na fagocitose levaram às observações de que o aumento do consumo de O_2 e de glicose ocorria na presença de inibidores da respiração mitocondrial, indicando que este processo não era devido ao requerimento de energia para o processo de fagocitose (SBARRA; KARNOVSKY, 1959). Em 1964, Rossi e Zatti demonstraram que o consumo de O_2 durante a explosão respiratória estava relacionado à ativação de uma NADPH oxidase, e Iyer et al. (1961) e Klebanoff (apud BABIOR 2000a) demonstraram que o O_2 extra consumido era utilizado para a produção de EROs.

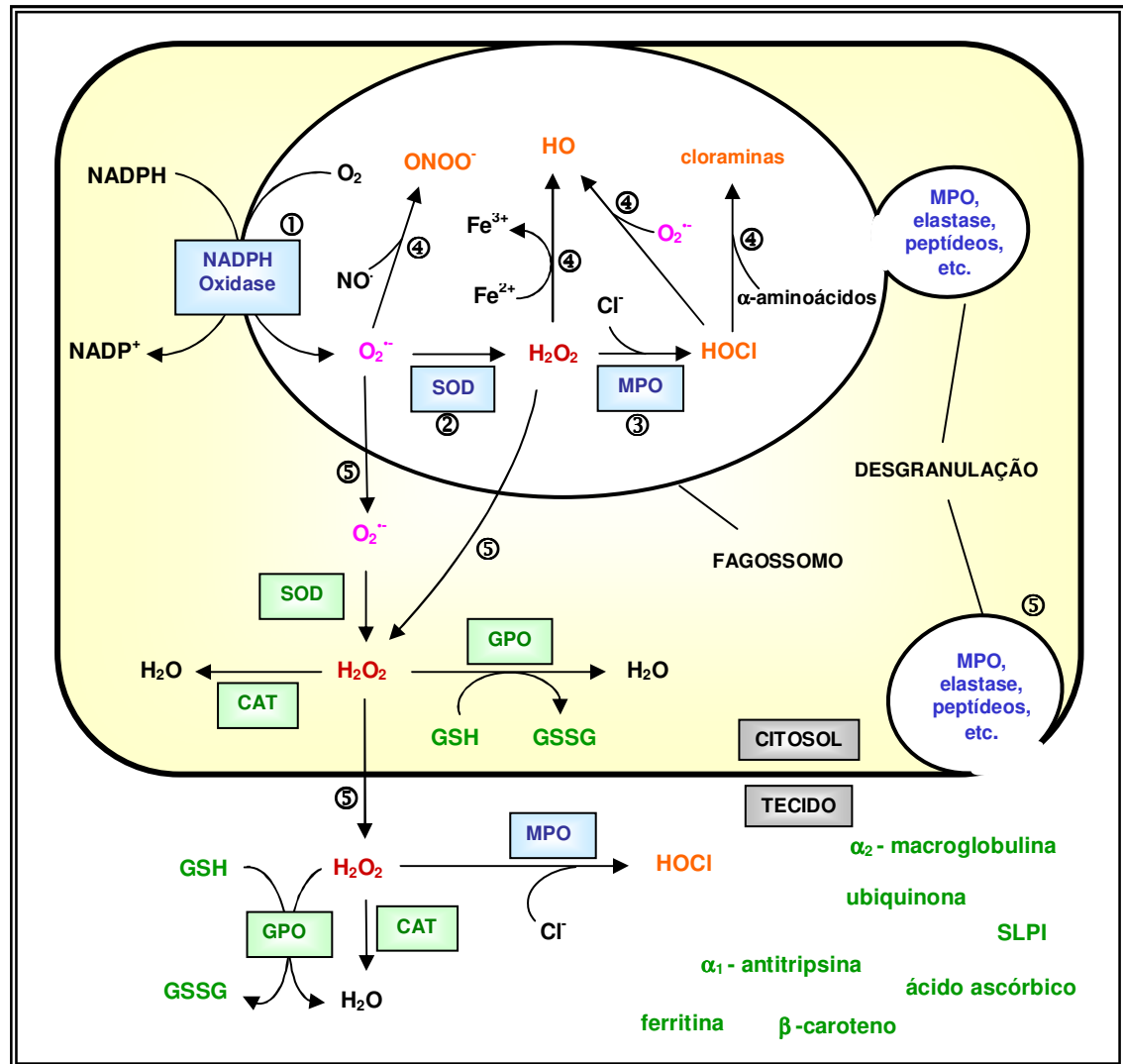


Figura 1.2. Representação simplificada das reações que ocorrem durante o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. **(1):** O ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é produzido pelo complexo enzimático da NADPH oxidase. **(2):** A dismutação do $O_2^{\bullet -}$ pela SOD produz o H_2O_2 . **(3):** A MPO proveniente 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). Esquema adaptado de Klein (1990), Weiss (1989) e Halliwell (1999). **Abreviaturas:** CAT: catalase; GPO: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; MPO: mieloperoxidase; SLPI: inibidor de protease secretória de leucócitos; SOD: superóxido dismutase.

A NADPH oxidase pode ser encontrada em células endoteliais (BABIOR, 2000b), em células renais (SHIOSE et al., 2001), em fagócitos profissionais (monócitos, macrófagos, neutrófilos) e em linfócitos B (BABIOR, 1999). O complexo da NADPH oxidase de fagócitos profissionais é composto por cinco componentes principais: p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox} e gp91^{phox} (phox = *phagocyte oxidase*). Os três primeiros existem no citosol na forma de um complexo e os outros dois formam o citocromo b₅₅₈, localizado na membrana de vesículas secretórias e de grânulos específicos. As subunidades p47^{phox} e p67^{phox} são também conhecidas como fator citosólico de neutrófilos tipo 1 e 2, (NCF-1, NCF-2), respectivamente. A atividade da NADPH oxidase depende de ainda da presença de uma GTPase (Rac 1-2) (BABIOR, 1999; BABIOR, 2000a; VIGNAIS, 2002; SHEPPARD et al., 2005; SELVACITI et al., 2006).

Seguchi e Kobayashi (2002) descreveram, baseados em análises de microscopia eletrônica, que após estimulação de neutrófilos com *n*-fMLP, o O₂^{•-} é gerado inicialmente dentro de um compartimento intracelular especializado contendo fosfatase alcalina, e não na membrana plasmática. De acordo com esses autores, os grânulos geradores de O₂^{•-} posteriormente se ligam à membrana plasmática ou fundem-se entre si, formando estruturas maiores que eventualmente se associam à membrana plasmática, levando à liberação extracelular de O₂^{•-}, aumentando a probabilidade de significativa oxidação extrafagossomal. Karlsson e Dahlgren (2002) sugerem que a ativação da NADPH ocorre também nas membranas dos grânulos, e que ocorre a fusão intra-citoplasmática desses grânulos produtores de O₂^{•-} com outros tipos de

grânulos dos neutrófilos, levando à formação de grânulos geradores de outras EROs, que então se fundem com a membrana plasmática ou com o fagossomo.

O papel da NADPH oxidase na defesa do organismo é clinicamente comprovado, uma vez que defeitos nos diferentes genes que codificam suas subunidades resultam em uma patologia rara conhecida como doença granulomatosa crônica. Esta doença genética é caracterizada pela redução da expectativa de vida decorrente de uma alta incidência do organismo contra infecções provocadas por várias classes de microrganismos, como bactérias e fungos (WIENTJES; SEGAL, 1995; HEYWORTH; CROSS; CURNUTTE, 2003; NATHAN, 2006).

Outra enzima importante envolvida no metabolismo oxidativo de neutrófilos é a MPO. Ela catalisa a oxidação de ions haleto (Cl^- , Br^- , I^-) e tiocianato (SCN^-) para ácidos hipo-halosos, utilizando H_2O_2 como substrato. O HOCl é o principal produto, devido à elevada concentração de Cl^- nos fluidos corporais. Além disso, o HOCl contribui para a produção de radicais HO^\bullet e de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (MALECH; GALLIN, 1987; McPHAIL; STRUM; LEONE, 1992; ROSEN et al., 1995; BABIOR, 1999; DAHLGREN; KARLSSON, 1999; PULLAR et al., 2000).

Os ácidos hipo-halosos, ou halogênios oxidados, podem, por sua vez reagir com diversas amins encontradas no sistema biológico, especialmente aminoácidos e proteínas, produzindo mono- e di-cloraminas. As cloraminas podem ter efeito tóxico para os microrganismos e para as células do hospedeiro, cuja intensidade depende da sua estrutura e capacidade de atravessar membranas. As cloraminas derivadas de α -aminoácidos são

susceptíveis à degradação, gerando aldeídos que por si só são tóxicos (PULLAR et al., 2000; BABIOR, 2000a).

Além da conhecida função microbicida, há várias evidências de que os oxidantes derivados de neutrófilos também desempenham outras funções. O H_2O_2 , HOCl, e algumas cloraminas são pequenas moléculas não carregadas que podem cruzar as membranas e difundir do fagossoma para o espaço extracelular. Alvos potenciais incluem quaisquer células nas imediações dos neutrófilos ativados, particularmente aquelas às quais eles estão aderidos, assim como os próprios neutrófilos ativados (HAMPTON; WINTERBOURN, 2002; NATHAN, 2006).

Por exemplo, as EROs têm sido descritas como mediadores essenciais da sinalização para muitos receptores de citocinas e hormônios, tais como aqueles para insulina, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fatores de crescimento de fibroblastos, angiotensina e TNF- α (SWAIN; ROHN; QUINN, 2002; NATHAN, 2003). O mecanismo molecular mais estudado de sinalização mediada por EROs é a inativação temporária de tirosino fosfatases por oxidação reversível de seus grupos sulfidrilas de cisteína ativos (HAMPTON; WINTERBOURN, 2002; OWUOR; KONG, 2002).

As EROs podem também contribuir para a liberação de proteases da matriz de peptidoglicanos nos grânulos, ou seja, ajudam na mobilização de proteases de neutrófilos (NATHAN, 2006). Os oxidantes derivados da NADPH oxidase têm sido propostos como reguladores da apoptose espontânea de neutrófilos, e como desencadeadores da exposição de fosfatidilserina e

eliminação de neutrófilos ativados (KASAHARA et al., 1997; FADEEL et al., 1998).

O HOCl pode desempenhar um papel fundamental na patofisiologia de doenças inflamatórias, atuando como mensageiro secundário na transdução intracelular de sinais, e também induz a produção da citocina TNF- α em células mononucleares por vias dependentes de tirosina-quinase (SCHIEVEN; DE FEX; STEPHENSON, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que a MPO, enzima produtora do HOCl, está envolvida em um grande número de processos inflamatórios, incluindo ativação e inativação de proteínas secretadas pelos neutrófilos, inativação de toxinas e de mediadores inflamatórios (FORMAN; THOMAS, 1986; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; WINTERBOURN; KETTLE, 2000).

1.2. Doenças mediadas por imunocomplexos (ICs)

1.2.1. Aspectos fisiopatológicos

A interação de substâncias estranhas e microrganismos com anticorpos específicos leva à formação de complexos antígeno-anticorpo, os quais são também conhecidos como complexos imunes ou imunocomplexos (ICs). Os antígenos que compõem esses ICs são geralmente provenientes de alimentos, medicamentos e componentes endógenos (auto-antígenos) (STEENSGAARD; JOHANSEN, 1980). Este processo constitui parte essencial dos mecanismos de defesa imune do organismo, sendo geralmente seguido por reações secundárias, como ativação do sistema complemento, que capacitam o organismo a

neutralizar e eliminar os antígenos citados (SCHIFFERLY; TAYLOR, 1989; ALONSO et al., 1998).

Em indivíduos saudáveis, pequenas quantidades de ICs circulantes podem ser encontrados no soro. Esses ICs circulantes inicialmente levam ao aumento da fagocitose e remoção do antígeno por macrófago no fígado e no baço. Além disso, hemácias que tem receptores CR1/CR3 podem se ligar aos ICs opsonizados com proteínas do sistema complemento e transportá-los ao fígado, onde esses ICs são removidos pelas células de Kupfer (HEBERT, 1991; PASCUAL; SCHIFFERLI, 1992). À medida que são formadas quantidades maiores de ICs, alguns deles se depositam nos leitos vasculares (FERNÁNDEZ; JANCAR; CRESPO, 2004).

Vários fatores determinam se a formação de ICs levará à deposição tecidual e doença. O tamanho dos complexos parece ser importante, sendo que os menores circulam por períodos maiores e se ligam com menor afinidade às células fagocíticas, o que aumenta a probabilidade de deposição nos tecidos (JARVIS et al., 1995, 1999). Um segundo fator é a disfunção do sistema fagocítico mononuclear, que aumenta a possibilidade de persistência dos ICs na circulação. Pode-se citar ainda a capacidade dos ICs de ativar o sistema complemento e o processo de fagocitose (MARZOCCHI-MACHADO et al., 1999; MICHELIN et al., 2002; ALVES et al., 2003). Além disso, a sobrecarga do sistema fagocítico com grandes quantidades de ICs também compromete sua habilidade de mediar a eliminação dos mesmos da circulação (DAVIES, 1995).

Os anticorpos presentes nos ICs depositados ativam a cascata do sistema complemento, que leva à liberação de fragmentos biologicamente ativos (C3a,

C5a). Esses fragmentos desencadeiam uma resposta inflamatória, com o recrutamento e ativação de leucócitos, predominantemente os neutrófilos, nos locais de deposição dos ICs (WEDMORE; WILLIAMS, 1981). Os ICs também podem ativar células inflamatórias e mastócitos a secretar citocinas e mediadores vasoativos, o que causa aumento da adesão de leucócitos ao endotélio, aumento da permeabilidade vascular e aumento da deposição de ICs nas paredes dos vasos por aumento dos espaços interendoteliais (ALONSO et al., 1998; JANCAR; CRESPO, 2005).

Os neutrófilos se ligam aos anticorpos dos ICs por meio de seus receptores $Fc\gamma R$, e às opsoninas do sistema complemento por meio de receptores CR. Essas células liberam enzimas lisosomais e metabólitos tóxicos de oxigênio enquanto fagocitam os ICs, e causando a destruição da parede dos vasos com microhemorragias associadas nos tecidos (WEISS; WARD, 1982; FERNÁNDEZ; JANCAR; CRESPO, 2004). As células endoteliais incham e proliferam, as plaquetas se agregam no lúmen, e a fibrina é depositada dentro e em volta do vaso, levando à ativação da cascata de coagulação. Em fases posteriores da lesão, ocorre a infiltração de macrófagos e linfócitos (MARRACK; KAPPLER; KOTZIN, 2001).

De modo semelhante a outros tipos de inflamação, as reações mediadas por ICs podem ser benéficas ou prejudiciais. Este tipo de inflamação frequentemente ocorre em conjunto com outros fenômenos mediados por anticorpos, como opsonização, durante respostas imunes normais. Por outro lado, é o mecanismo primário envolvido em vários tipos de hipersensibilidade. A reação de Arthus, por exemplo, pode frequentemente ser observada em locais

de inoculação subcutânea de antígenos para tratamento de alergia, e também ocorre como resposta a picadas de insetos ou medicamentos injetados. Essas reações são geralmente limitadas a edema e infiltração celular moderada, com lesão vascular de pequena intensidade (SYLVESTRE; RAVETCH, 1994; RAJAN, 2003).

Os locais mais favoráveis para deposição dos ICs são os pequenos vasos, rins e articulações, uma vez que os capilares dos glomérulos renais e da sinóvia das articulações são vasos nos quais o plasma é ultrafiltrado (para a formação da urina e do líquido sinovial, respectivamente) atravessando a parede do capilar em pressão hidrostática elevada. Por esta razão, as manifestações clínicas e patológicas das doenças mediadas por ICs, também chamadas de reações de hipersensibilidade do tipo III, são vasculite, nefrite e artrite (SCHIFFERLI; TAYLOR, 1989; JANCAR; CRESPO, 2005).

As doenças associadas com a deposição tecidual de ICs incluem infecções virais (hepatite B, citomegalovírus) e bacterianas (*meningococcus*, *streptococcus*, *staphylococcus*); várias doenças inflamatórias com componentes auto-imunes, como a artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico; reações de hipersensibilidade a drogas, como antibióticos, antiinflamatórios não esteroidais e antidepressivos (JANCAR; CRESPO, 2005).

1.2.2. Participação dos neutrófilos

A presença de receptores de membrana das classes Fc γ R e CR nos neutrófilos confere a essas células a propriedade de interagir com ICs e fagocitá-los (ERNST; ROSALES; ZIMMERLI, 1995; LÖFGREN et al., 1999). Nas doenças mediadas por ICs, onde geralmente há intensa formação e deposição de ICs em diversos órgãos, como rins e articulações, as células fagocíticas não conseguem englobar a grande massa de IC depositada. Este processo leva à "fagocitose frustrada", onde ocorre liberação maciça das diversas proteases dos grânulos dos neutrófilos e das EROs derivadas do metabolismo oxidativo para o meio extracelular (SCHIFFERLI; TAYLOR, 1989; WEISS, 1989).

O organismo se protege das lesões pelas enzimas líticas liberadas pelos neutrófilos através das anti-proteinases, como a α 1-anti-proteinase presente em abundância nos pulmões (MALECH; GALLIN, 1987; NATHAN, 2006), e das EROs através de enzimas (SOD, catalase, glutathione peroxidase, DT diaforase), de proteínas quelantes de ferro (lactoferrina, ferritina), e de compostos antioxidantes (vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno, ácido úrico, glutathione, ubiquinona, ceruloplasmina) (HALLIWELL, 1990; DAVIES, 2000). Os componentes do sistema de defesa antioxidante podem ser encontrados nos fluidos biológicos, nos tecidos e em diferentes compartimentos celulares. O organismo conta ainda com sistemas de reparo e de remoção de constituintes celulares danificados (DAVIES, 2000).

Em certas condições como intensa atividade fagocítica e inflamações crônicas pode haver aumento da produção de oxidantes e/ou depleção das defesas antioxidantes, de modo que os mecanismos de defesa são superados e

a lesão tecidual ocorre. Este desequilíbrio é conhecido como "estresse oxidativo" (HALLIWELL, 1990; KEHRER, 1993; DAVIES, 2000; BABIOR, 2000a).

Além disso, as EROs inativam pelo menos três das principais anti-proteases teciduais [α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, SLPI (inibidor de protease secretória de leucócitos)], favorecendo a atuação deletéria das proteases liberadas pelos neutrófilos sobre os tecidos (WEISS, 1989; NATHAN, 2006). Recentes descobertas indicam que as EROs desempenham ainda um papel-chave na modulação da ativação de neutrófilos, através da regulação positiva das respostas celulares mediadas por receptores Fc γ R, favorecendo a amplificação da lesão tecidual (PRICOP; SALMON, 2002).

Além das EROs e das enzimas proteolíticas, os peptídeos e proteínas antimicrobianos produzidos por neutrófilos, particularmente a elastase, catepsina G, proteinase-3, azurocidina e a proteína promotora de permeabilidade bacteriana (BPI), também têm sido descritos como alvos de auto-anticorpos em uma variedade de doenças auto-imunes. A azurocidina e a proteinase-3 são alvos de anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) em pacientes com vasculites sistêmicas, incluindo a granulomatose de Wegner (ZHAO; LOCKWOOD, 1996; PENDERGRAFT et al., 2004). Pacientes com fibrose cística, doença inflamatória intestinal, vasculite geralmente desenvolvem ANCA contra BPI. A presença de BPI-ANCA em tais pacientes é associada com elevada atividade de doença inflamatória e lesão em órgãos (SCHULTZ et al., 2001; HEERINGA; HUUGEN; TERVAERT, 2005).

1.3. Cumarinas

1.3.1. Biogênese e ocorrência

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas, encontrados em diferentes famílias de Angiospermae como Apiaceae, Rutaceae e Asteraceae (GRAY; WATERMAN, 1978; MURRAY, 1989; RIBEIRO; KAPLAN, 2002). Estruturalmente, as cumarinas são lactonas do ácido *orto*-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas), sendo que a Cumarina (1,2-benzopirona) é a representante mais simples dos compostos dessa classe (GRAY; WATERMAN, 1978) (Figura 1.3).

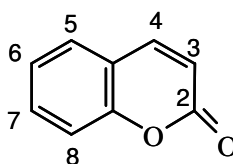


Figura 1.3. Núcleo fundamental das cumarinas. (KUSTER; ROCHA, 2004).

A palavra cumarina é originária do caribenho *cumaru*, nome popular de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., Fabaceae. O *cumaru*, também conhecido por fava-tonka, é encontrado no norte do Brasil e suas sementes contêm grande quantidade de cumarina, em torno de 1 a 3%. A maioria das cumarinas encontradas em plantas é derivada biogeneticamente da via metabólica do ácido chiquímico (KUSTER; ROCHA, 2004) (Figura 1.4).

As cumarinas simples são encontradas com maior frequência, enquanto que as cumarinas com estruturas químicas mais complexas, como as furanocumarinas, piranocumarinas, lignocumarinas, bis-cumarinas e tris-

cumarinas ocorrem em poucas famílias, notadamente as mais primitivas (RIBEIRO; KAPLAN, 2002; KUSTER; ROCHA, 2004). Alguns derivados de cumarinas são encontrados em microrganismos, como os agentes antimicrobianos novobiocina, clorobicina e coumermicina A, produzidos por *Streptomyces* spp. (KAWASE et al., 2001), e as aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus* spp. (PALMGREN; CIEGLER, 1983 *apud* HOULT; PAYÁ, 1996).

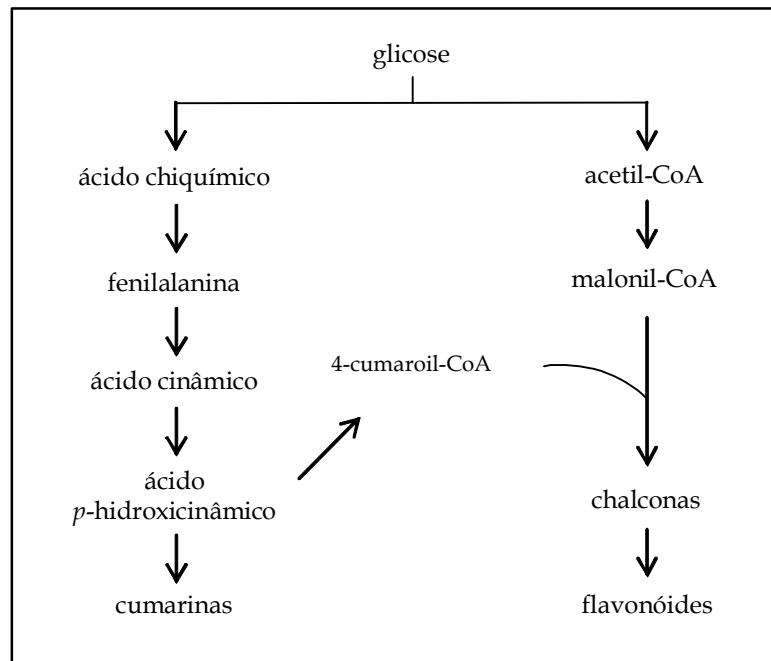


Figura 1.4. Esquema simplificado das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de cumarinas e flavonóides em plantas. CoA: coenzima A. Adaptado de Santos (2004).

1.3.2. Atividades biológicas

A Cumarina tem odor adocicado, e é comercialmente utilizada como aromatizante em produtos cosméticos, produtos de limpeza, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados (LAKE, 1999). Como produto farmacêutico, a Cumarina é comercializada em associação com a heparina ou a tri-hidroxiethylrutina (Venalot[®]) para o tratamento de varizes (P.R. ...,2004), e está em fase de triagem clínica para o tratamento de carcinomas pulmonares, renais e de próstata (FELTER et al., 2006). Os derivados furanocumarínicos 8-metoxipsoraleno (metoxsaleno) e 2,5,8-trimetilpsoraleno (trioxsaleno) são comercializados nos Estados Unidos, sendo utilizados para o tratamento de vitiligo e psoríase (GUZZO; LAZARUS; WERTH, 1996).

Na área de medicamentos destacam-se ainda os anticoagulantes orais derivados da 4-hidroxicumarina, como o dicumarol, a varfarina, a femprocumona e o acenocumarol, amplamente empregados na terapêutica de doenças tromboembólicas (MAJERUS et al., 1996). A propriedade anticoagulante do dicumarol foi descoberta durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro amarelo fermentado (*Melilotus officinalis* Lam.), nas planícies do Canadá (MAJERUS et al., 1996). Este composto foi o protótipo para o desenvolvimento da classe de anticoagulantes orais com o núcleo básico da 4-hidroxicumarina, a partir da qual foi sintetizada a varfarina sódica, no ano de 1948 (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JÚNIOR, 2004).

A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico pelas cumarinas, pelo fato dessas substâncias

mostrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para mamíferos (HOULT; PAYÁ, 1996). Uma grande diversidade de atividades biológicas, tanto para as cumarinas simples quanto para as de estruturas químicas mais complexas isoladas de fontes naturais, tem sido descrita na literatura, tais como: antiinflamatória (KIMURA et al., 1985; HOULT; MORONEY; PAYÁ, 1994; GARCÍA-ARGÁEZ, 2000; LEAL et al., 2000), antimalárica (BRAVO et al., 1999; OKETCH-RABAH et al., 2000), antimicrobiana (VARANDA et al., 1997; QUADRI-SPINELLI et al., 2000), antioxidante (NG; LIU; WANG, 2000; KANEKO; BABA; MATSUO, 2003; YU, J. et al., 2005), inibidora da produção de óxido nítrico (KANG et al., 1999; MOTAI; DAIKONYA; KITANAKA, 2004), tripanocida (VIEIRA et al., 2001), antiviral (MARTÍN-ARAGÓN; BENEDI; VILLAR, 1996; ZHOU et al., 2000) e antineoplásica *in vitro* (GUNATILAKA; KINGSTON, 1994; KOLODZIEJ et al., 1997; KOFINAS et al., 1998; YANG et al., 1999; QUADRI-SPINELLI et al., 2000; CHU et al., 2001).

Nas últimas décadas, tem-se notado um interesse crescente na busca de novos fármacos a partir da modificação química do esqueleto cumarínico, associada a estudos sistemáticos de relação estrutura-atividade qualitativa ou quantitativa. Neste contexto, um dos trabalhos pioneiros foi realizado por Lopes et al. (1976), que avaliou a ação quimioprolifática de derivados de cumarinas simples sobre a esquistossomose.

Na década de 1990, a relação entre a estrutura química de diversas cumarinas simples hidroxiladas, metoxiladas e glicosiladas, e a atividade antioxidante (PAYÁ et al., 1992; MARTÍN-ARAGÓN; BENEDÍ; VILLAR, 1996;

CHANG et al., 1996; FOTI et al., 1996; RAJ et al., 1998a, 1998b; LIU, Z.-Q.; YU; LIU, Z.-L., 1999; YU; LIU, Z.-Q.; LIU, Z.-L., 1999), antiinflamatória (PAYÁ et al., 1992, 1993; HOULT; MORONEY; PAYÁ, 1994; HOULT; PAYÁ, 1996) ou antitumoral (KOLODZIEJ et al., 1997) dessas substâncias foi investigada em diversos trabalhos, empregando modelos experimentais enzimáticos, químicos e celulares.

A partir do ano de 2000, têm se encontrado na literatura um maior número de relatos de síntese e avaliação da atividade biológica de derivados cumarínicos modificados com grupos substituintes alílicos, aromáticos ou heterocíclicos. Por exemplo, Gnerre et al. (2000) e Chimenti et al. (2004) relatam o estudo do efeito inibitório de uma série de cumarinas halogenadas sobre a atividade de monoamino oxidases, e Reddy et al. (2004) relatam o processo de síntese e avaliação de atividade antitumoral de uma série de derivados 3-(*N*-aril)-sulfonamídicos de cumarinas.

As modificações estruturais no esqueleto cumarínico, visando à descoberta de novos derivados com atividade antiinflamatória, também têm recebido destaque nos últimos seis anos. Diversos trabalhos relatam a avaliação da atividade inibitória sobre o processo inflamatório induzido em modelos animais (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2003, 2004, 2005; GHATE et al., 2003, 2005; NICOLAIDES et al., 2004; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005; KHAN et al., 2005), e também sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resposta inflamatória, como a produção de radicais livres (MURAKAMI et al., 2000; VAJRAGUPTA; BOONCHOONG; WONGKRAJANG, 2000; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2003, 2005; KUMAR et al., 2005),

produção de TNF- α (CHENG et al., 2004), atividade da lipoxigenase (NICOLAIDES et al., 2004; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005; GRIMM et al., 2006), cicloxigenase (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005) e elastase (DOUCET et al., 1999), e expressão de ICAM por células endoteliais (KUMAR et al., 2005).

A presença de grupos substituintes hidroxí tem sido descrita como característica estrutural importante para a atividade antiinflamatória e antiedematogênica das cumarinas (HOULT; MORONEY; PAYÁ, 1994; HOULT; PAYÁ, 1996; GARCÍA-ARGÁEZ et al., 2000). Por outro lado, a esterificação desses grupos substituintes também tem sido relatada como uma modificação estrutural que parece contribuir para o aumento da atividade inibitória de cumarinas e flavonóides sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos (KABEYA et al., 2002; VUOTTO et al., 2003), a produção de óxido nítrico por macrófagos (CHEN et al., 2001) e a peroxidação lipídica (RAJ et al., 1998b).

1.4. 3-Fenilcumarinas

As 3-fenilcumarinas, também denominadas 3-aryl-cumarinas ou aril-3-cumarinas, apesar de possuírem o esqueleto cumarínico, são classificadas como uma sub-classe de isoflavonóides. Esses compostos são produzidos pela mesma via biossintética dos outros flavonóides (Figura 1.4), e são também caracterizados estruturalmente por uma cadeia C6-C3-C6, mas do tipo difenil-1,2-propano (McCUE; SHETTY, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004) (Figura 1.5).

Ao contrário das outras classes de flavonóides, a distribuição taxonômica dos isoflavonóides é restrita, ocorrendo quase que exclusivamente em Fabaceae. Entretanto, essa classe apresenta uma ampla diversidade estrutural, e compreende, além das 3-fenilcumarinas, as isoflavonas, isoflavanonas, isoflavenos, pterocarpanos, cumestanos e cumarocromonas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

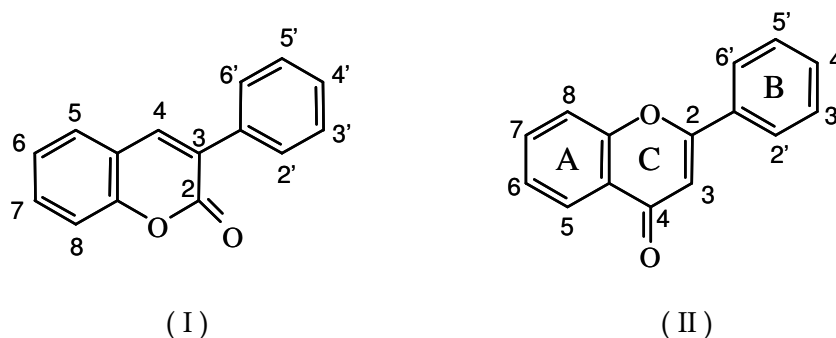


Figura 1.5. Núcleo fundamental das 3-fenilcumarinas (I) e dos flavonóides (II). (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Nas plantas, os isoflavonóides exercem atividade antimicrobiana e inseticida, assim como a grande maioria das classes de metabólitos secundários vegetais (TREUTTER, 2005). Em mamíferos, os mais amplamente estudados são os isoflavonóides extraídos da soja, como a genisteína e daidzeína, que exercem efeito estrogênico e parecem auxiliar na prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares (revisado por McCUE; SHETTY, 2004).

Para as 3-fenilcumarinas, foram descritas as seguintes atividades biológicas: atividade antifúngica (WEIDENBORNER; JHA, 1995 *apud* TUNALLI et al., 2004), atividade inibitória sobre a agregação plaquetária (TAWATA et al.; 1990), e a atividade antibacteriana de três substâncias isoladas de *Erythrina indica*, denominadas ácido robústico, indicanina A e indicanina B (NKENGFAK

et al., 2000; WAFFO et al. 2000). Recentemente, Tunali et al. (2004) relataram a atividade anticoagulante da 6,7-diidroxí-3-fenilcumarina, e Marchi et al. (2004) relataram a atividade inibitória de derivados de 3-fenilcumarinas sobre a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*.

1.5. Flavonóides

1.5.1. Biogênese e ocorrência

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, encontrados em relativa abundância entre os metabólitos secundários vegetais. Essa classe de substâncias apresenta grande diversidade estrutural, amplamente distribuída no reino vegetal, principalmente em Angiospermae. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ação antimicrobiana) e de atração de polinizadores (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

O esqueleto básico dos flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (Figura 1.5), resulta das vias biossintéticas do ácido chiquímico e do acetato (acetil-CoA) (Figura 1.4) (FORMICA; REGELSON, 1995). Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e conjugados com açúcares, formando C-heterosídeos ou O-heterosídeos. A forma não ligada a moléculas de açúcar é chamada de aglicona ou genina (SPANOS; WROLSTAD, 1992; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Os flavonóides são encontrados em uma grande variedade de alimentos, como chá preto, cebola, maçã, uva e verduras, fazendo parte da dieta humana. Estima-se que o consumo de flavonóides seja de 25 mg/dia, sendo que aproximadamente 5% consiste de quercetina (QUER) e seus derivados glicosilados (BROWN, 1980; WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).

1.5.2. Quercetina

Na década de 1930, Szent-Gyorgyi isolou uma nova substância da laranja, que se acreditava ser uma nova vitamina e, por esta razão, foi denominada vitamina P. Alguns anos mais tarde, descobriu-se que essa substância era, na realidade, o flavonóide rutina, um análogo O-glicosilado da quercetina (QUER). A partir de então, inúmeros compostos da classe dos flavonóides têm sido isolados e avaliados quanto às suas propriedades biológicas (FORMICA; REGELSON, 1995; NIJVELDT et al., 2001).

A QUER (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona), identificada pela primeira vez em *Quercus* sp., é um dos flavonóides mais comuns nos vegetais, para o qual foram descritas inúmeras atividades biológicas (revisadas por FORMICA; REGELSON, 1995; MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; NIJVELDT et al., 2001): anti-hipertensiva, anti-aterogênica, antiarritmica, antialérgica, antineoplásica, antiagregante plaquetária, antiviral, antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória. Esta última atividade têm sido atribuída ao efeito inibitório da QUER sobre diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, tais como: formação de leucotrienos, pelas vias da

ciclooxigenase e da lipoxigenase (LAUGHTON et al., 1991); expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (KIM; LIU; MEYDANI, 2006); produção de óxido nítrico por macrófagos (MATSUDA et al., 2003); desgranulação de neutrófilos e mastócitos (MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Além dos mecanismos mencionados, a inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos (LIMASSET et al., 1993, 1999; KANASHIRO et al., 2004, 2006; SIMÕES et al., 2004) também parece ter importante participação no controle da inflamação. A modulação dessa função dos neutrófilos pela QUER têm sido atribuída à inibição da atividade do complexo da NADPH oxidase (TAUBER, 1984) e da mieloperoxidase (HART et al., 1990), ao bloqueio de vias de sinalização mediadas por proteínas quinases (revisado MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000), e à captura de radicais livres.

A ação da QUER como capturador (scavenger) de radicais livres ($O_2^{\cdot-}$; HO^{\cdot} , ROO^{\cdot}), e também como quelante de íons metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+}), impedindo-os de atuar como catalisadores da produção de radicais livres, foi relatada em modelos experimentais não celulares, onde os radicais livres foram gerados por reações químicas ou enzimáticas (LAUGHTON et al., 1989; MORA et al., 1990; ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998; PANNALA et al., 2001; COS et al., 2003; MONTORO et al., 2005). Dessa forma, a QUER pode interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres, tanto no meio intracelular quanto no extracelular.

1.6. Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais

Os produtos de origem natural (plantas, microrganismos, organismos marinhos) são utilizados pela humanidade há séculos. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa durante períodos de guerra. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. No início do século passado, esses recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e se estabeleceu paulatinamente a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados princípios ativos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicatos obtidos de *Salix Alba*, no início do século XIX. Posteriormente, esses compostos foram quimicamente modificados, originando o ácido acetil-salicílico, amplamente utilizado na terapêutica atual como analgésico, antitérmico, antiinflamatório e inibidor de agregação plaquetária. Entretanto, foi no período após a II Guerra Mundial que o desenvolvimento dos fármacos sintéticos prosperou de modo mais significativo (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte dos fármacos utilizados na terapêutica atual é obtida de matérias-primas vegetais, em função da dificuldade em obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, ou da inviabilidade econômica do processo de síntese em laboratório (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004). Alguns exemplos de fármacos extraídos de plantas são os antimaláricos artemisinina e quinina, os antitumorais vincristina e vimblastina, os antiglaucomatosos fisostigmina e pilocarpina. Entre os fármacos obtidos a partir de precursores extraídos de fontes vegetais incluem-se diversos hormônios esteroidais, que são sintetizados a partir dos alcalóides esteroidais diosgenina, hecogenina e estigmasterol; o agente espasmolítico N-butilescolamina, obtido a partir da escopolamina; os antineoplásicos paclitaxel e docetaxel, sintetizados a partir da desacetil-10-bacatina III, que é um taxóide isolado de *Taxus baccata* L. (BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JÚNIOR, 2004; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004).

Além da extração de princípios ativos de fontes naturais, outras estratégias utilizadas na descoberta de novos fármacos são a triagem empírica, a modificação molecular de fármacos conhecidos e o planejamento racional (BARREIRO; FRAGA, 2001). No Brasil, em função da ampla biodiversidade, que tem propiciado a descoberta de substâncias com estruturas químicas diversas, tem-se notado um rápido crescimento da busca de medicamentos sintéticos a partir da modificação da estrutura molecular de produtos naturais (MONTANARI, 1995; BARREIRO; FRAGA; ARAÚJO JÚNIOR, 2004).

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade biológica de uma série de vinte 3-fenilcumarinas, estruturalmente análogas, nas funções efectoras de neutrófilos estimulados por imunocomplexos (ICs) constituídos de imunoglobulina da classe G (IgG) e ovalbumina (OVA), investigar os mecanismos de ação dessas substâncias e analisar a relação estrutura-atividade.

3 . Material e métodos

3.1. Abordagem experimental

Com o intuito de atingir os objetivos especificados no item 2, a abordagem experimental utilizada para o desenvolvimento deste trabalho compreendeu as seguintes etapas:

- ✓ Seleção de um conjunto de 3-fenilcumarinas, estruturalmente análogas, com pequenas variações quanto ao número e posição dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi.

- ✓ Avaliação da toxicidade das 3-fenilcumarinas sobre neutrófilos, por meio da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células, e da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán.

- ✓ Avaliação do efeito modulatório das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados especificamente via receptores Fc γ R e/ou CR, por meio de diferentes tipos de ICs constituídos de IgG e OVA. Foram empregados os ensaios de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}) e de quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc^{PMN}) para a medida da produção de diferentes EROs pelas células estimuladas.

- ✓ Avaliação do efeito das 3-fenilcumarinas sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos.

- ✓ Investigação do potencial antioxidante e/ou pró-oxidante das 3-fenilcumarinas, empregando dois modelos experimentais não celulares: (1) avaliação da capacidade redutora frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); (2) avaliação da atividade antioxidante empregando a reação *horseradish peroxidase* (HRP)-H₂O₂-luminol.

- ✓ Análise qualitativa da relação entre a estrutura química e as atividades biológicas das 3-fenilcumarinas, avaliadas em modelos experimentais celulares e não celulares.

3.2. Substâncias estudadas

3.2.1. 3-Fenilcumarinas

A série de 3-fenilcumarinas (Figura 3.1) foi sintetizada pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Monica Tallarico Pupo, do laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). No presente estudo, foram utilizados os mesmos códigos de identificação de cada substância estabelecidos durante o processo de síntese.

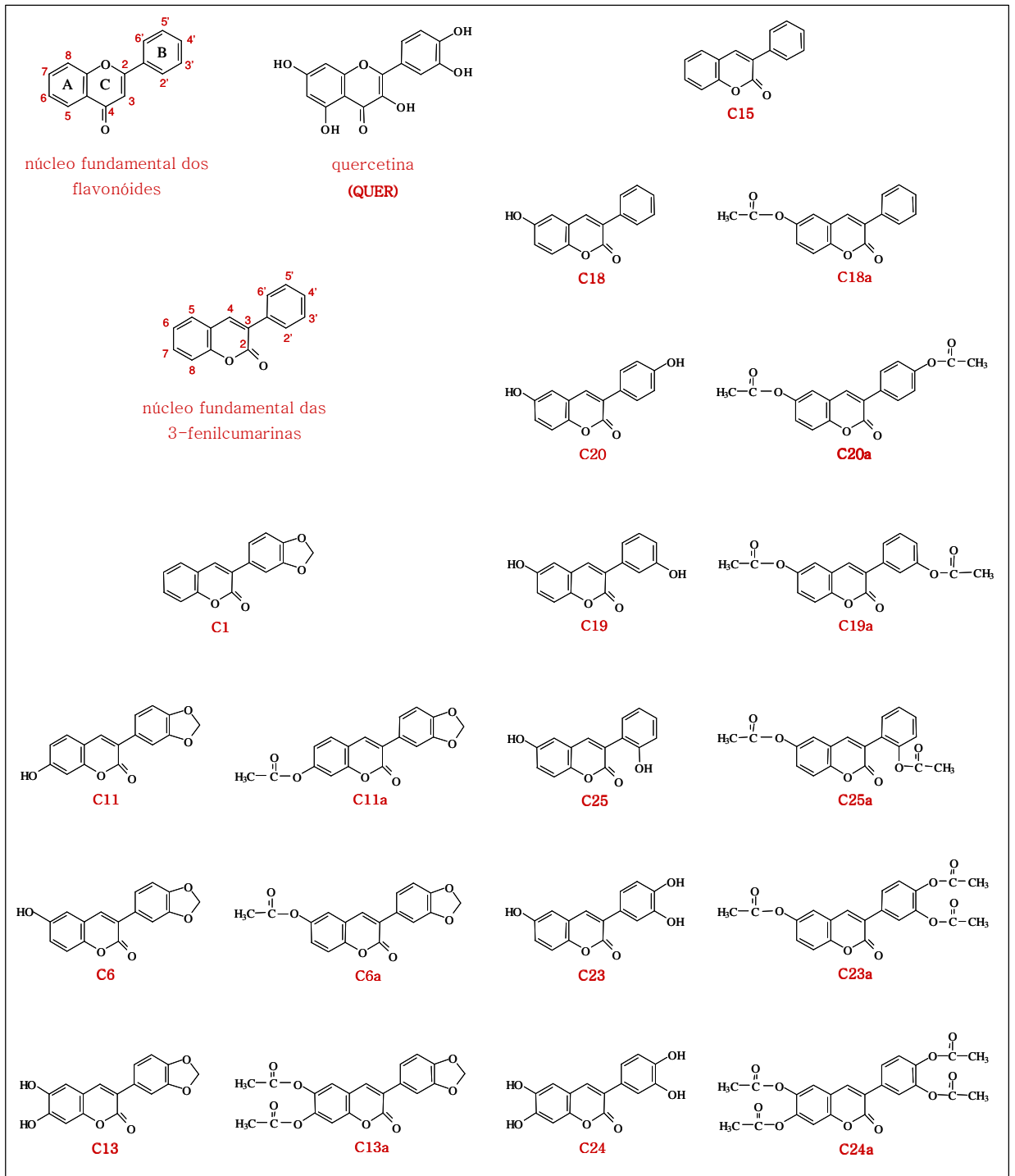


Figura 3.1. Estrutura química da quercetina e das 3-fenilcumarinas estudadas. Os códigos de identificação das 3-fenilcumarinas (em vermelho, abaixo de cada estrutura) foram estabelecidos durante o processo de síntese dessas substâncias, no laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP.

O procedimento de síntese das 3-fenilcumarinas **C1**, **C6**, **C6a**, **C11** e **C11a** está descrito no trabalho de Marchi et al (2004) e o das demais substâncias no trabalho de Kabeya et al (submetido). De modo resumido, as 3-fenilcumarinas acetoxiladas foram sintetizadas em meio anidro, a partir de derivados hidroxilados do ácido fenilacético e de derivados hidroxilados do benzaldeído, na presença de acetato de potássio e anidrido acético. As 3-fenilcumarinas hidroxiladas foram obtidas através de hidrólise em meio ácido das respectivas análogas acetoxiladas. Todas as 3-fenilcumarinas sintetizadas foram purificadas por recristalização, avaliadas quanto à pureza por cromatografia em camada delgada e caracterizadas pela determinação do ponto de fusão. As estruturas químicas foram elucidadas por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray*.

A escolha dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi foi feita com base em um estudo preliminar, envolvendo 3-fenilcumarinas com diferentes padrões de substituição, e em resultados obtidos durante um trabalho anterior (KABEYA et al, 2002), no qual foi observado que as cumarinas simples, contendo esses grupos substituintes, foram as mais efetivas em inibir o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados por zimosan opsonizado (Ziops). Além disso, foram selecionadas 3-fenilcumarinas com pequenas diferenças estruturais entre si, no que se refere à posição dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi, de modo a permitir um estudo de relação estrutura-atividade.

3.2.2. Quercetina

A 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), mais conhecida como quercetina (**QUER**), foi selecionada como substância de referência para comparação das atividades biológicas das 3-fenilcumarinas, uma vez que a atividade biológica desse flavonóide sobre os modelos experimentais propostos neste trabalho está amplamente descrita na literatura (TAUBER, 1984; YAMASAKI; SAKIHAMA; IKEHARA, 1997; MIURA; MURAOKA; FUJIMOTO, 2003; KANASHIRO et al., 2004; KANASHIRO et al., 2006). A estrutura química da QUER está representada na figura 3.1.

3.2.3. Avaliação de solubilidade das 3-fenilcumarinas em meio aquoso

A solubilidade das 3-fenilcumarinas em meio aquoso foi avaliada nas concentrações finais de 200, 100 e 50 $\mu\text{mol/L}$, empregando-se solução de Hanks (pH 7,2) (PAUL, 1970). Foram classificadas como insolúveis (i) as substâncias que precipitaram no meio de reação após 30 minutos em temperatura ambiente, e como solúveis (s) aquelas em que a solução permaneceu límpida após esse mesmo período de tempo.

Observou-se que a maioria das substâncias hidroxiladas foi solúvel nas três concentrações avaliadas, enquanto que as respectivas análogas acetoxiladas e a maioria das 3-fenilcumarinas com grupo substituinte 3',4'-metilenodioxi foram solúveis no meio de reação apenas na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 3.1). Assim, foi selecionada 50 $\mu\text{mol/L}$ como a concentração

máxima para avaliação da atividade biológica das 3-fenilcumarinas em meio aquoso, na qual todas as substâncias foram solúveis.

Tabela 3.1. Avaliação da solubilidade das 3-fenilcumarinas em solução de Hanks.^(a)

Substância ^(b)	Concentração ($\mu\text{mol/L}$)		
	200	100	50
C1	i	i	s
C6	i	i	s
C6a	i	i	s
C11	i	i	s
C11a	i	i	s
C13	i	s	s
C13a	i	i	s
C15	i	s	s
C18	s	s	s
C18a	i	i	s
C19	s	s	s
C19a	i	i	s
C20	s	s	s
C20a	i	i	s
C23	s	s	s
C23a	i	i	s
C24	s	s	s
C24a	i	i	s
C25	s	s	s
C25a	i	i	s

(a) Classificação em insolúvel (i) ou solúvel (s) baseada na formação ou não de precipitado, após 30 minutos em temperatura ambiente.

(b) estruturas químicas representadas na Figura 3.1.

3.3. Animais

Foram utilizados coelhos da espécie Nova Zelândia (New Zealand White), fêmeas, adultos jovens, com peso corporal de aproximadamente 2,5 Kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram empregados para produção de anticorpos e para colheita de sangue periférico (utilizado para obtenção de soro e para o isolamento de neutrófilos). Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. (protocolo n. 05.1.1050.53.9) (Anexo A).

3.4. Isolamento de neutrófilos

Os neutrófilos de coelho foram isolados de acordo com o método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano e Mantovani (1984), relatado de modo resumido a seguir.

O sangue foi colhido por punção na artéria medial da orelha dos coelhos, utilizando-se solução de Alsever pH 6,1 (v/v) como anticoagulante, e centrifugado a 755g por 10 minutos a 4°C. O plasma e a camada de leucócitos mononucleares foram desprezados, e o sedimento restante foi adicionado de solução de gelatina a 2,5% (preparada em solução de NaCl a 0,15 mol/L) e incubado a 37°C por 30 minutos. A camada sobrenadante, rica em leucócitos polimorfonucleares, foi removida, diluída em solução de NaCl (0,15 mol/L), e centrifugada a 270g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em solução

de NH_4Cl (0,83%; pH 7,2) e, após 5 minutos, centrifugado a 480g por 10 minutos a 4°C, lavado com solução de NaCl (0,15 mol/L) e novamente centrifugado a 270g por 8 minutos a 4°C. Por fim, o sedimento de células foi suspenso em solução de Hanks (pH 7,2) suplementada com 0,1% de gelatina.

Uma alíquota da preparação de células obtida foi diluída em líquido de Turk, para contagem do número de células em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán. Através do procedimento descrito, foram obtidas preparações de células com viabilidade maior que 95%, contendo de 80 a 90% de neutrófilos.

3.5. Obtenção de soro normal

O sangue colhido por punção na artéria medial da orelha dos coelhos, sem anticoagulante, foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 1 hora, e depois centrifugado a 755g por 15 minutos. O soro obtido de diferentes animais foi reunido e centrifugado novamente, nas mesmas condições, para remoção de hemácias remanescentes. Por fim, o soro foi fracionado em *ependorfs* e armazenado em freezer a -70°C.

3.6. Obtenção, purificação e caracterização da preparação de IgG rica em IgG anti-OVA

Esta etapa foi realizada com o intuito de obter preparações de IgG total contendo IgG anti-OVA, a qual foi utilizada para o preparo de ICs.

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

A solução de antígeno (5 mg de OVA em 1 mL de solução de NaCl a 0,15 mol/L) foi emulsionada em adjuvante completo de Freud (1:1) e administrada por via subcutânea no dorso do animal. Após um período de 30 dias, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (5 mg/Kg) e ketamina (35 mg/Kg), administrada por via intramuscular (LIPMAN; PHILLIPS; NEWCOMER., 1990; POPILSKIS et al., 1991; MARINI et al., 1992). O sangue foi colhido por punção cardíaca e, logo após o procedimento, os animais foram eutanasiados com injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio (50 mg/Kg).

O sangue colhido foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 1 hora, para coagulação, e então centrifugado a 755g por 15 minutos. O soro dos diferentes animais foi reunido e mantido em banho maria a 56°C por 30 minutos, para inativação dos componentes do sistema complemento, e depois resfriado em banho de gelo.

3.6.2. Purificação do soro imune para obtenção de IgG total

A IgG foi separada dos outros componentes do soro imune seguindo-se a metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984). Esta permite obter como produto final uma preparação contendo IgG total, ou seja, tanto IgG específica para o antígeno administrado (IgG anti-OVA) quanto para outros antígenos que o animal tenha entrado em contato no decorrer de sua vida (FAHEY; WUNDERLICH; MISHELL, 1964).

Inicialmente, a fração globulina do soro imune foi precipitada pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em quantidade suficiente para que a saturação final da mistura fosse de 40%. Essa mistura foi mantida em repouso a 4°C por 24 horas e centrifugada a 3000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% de saturação, centrifugado novamente, nas mesmas condições, e posteriormente dissolvido em água deionizada.

A fração globulina foi dialisada contra solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) a 4°C, empregando-se membranas de diálise com limite de exclusão de 14 kDa, e purificada por cromatografia de troca iônica. Foi utilizada a resina dietilaminoetil (DEAE)-celulose como fase estacionária e solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) como fase móvel, sob fluxo de 1 mL/minuto. O efluente da coluna foi recolhido por um coletor automático em volumes fixos de 5 mL, em temperatura ambiente, e a presença de proteínas nas frações foi detectada através da leitura da absorbância em 280 nm (Espectrofotômetro DU-70, Beckman, USA). Após a eluição do primeiro grupo de proteínas (IgG total; grupo 1), a fase móvel foi substituída por solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) suplementado com 1 mol/L de NaCl, para eluição das demais proteínas contidas na amostra (grupo 2) (Figura 3.2).

As frações cromatográficas correspondentes ao primeiro grupo de proteínas eluídas (grupo 1) foram reunidas e concentradas por filtração, utilizando-se membranas de celulose com limite de exclusão de 50 kDa. Finalmente, a amostra concentrada foi dialisada contra solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) a 4°C, e posteriormente fracionada em *ependorfs* e armazenada a -20°C. A concentração de proteínas nesta amostra

foi determinada por leitura de absorvância em 280 nm [coeficiente de extinção específico = 13,986 (solução a 1%, caminho óptico de 1cm)].

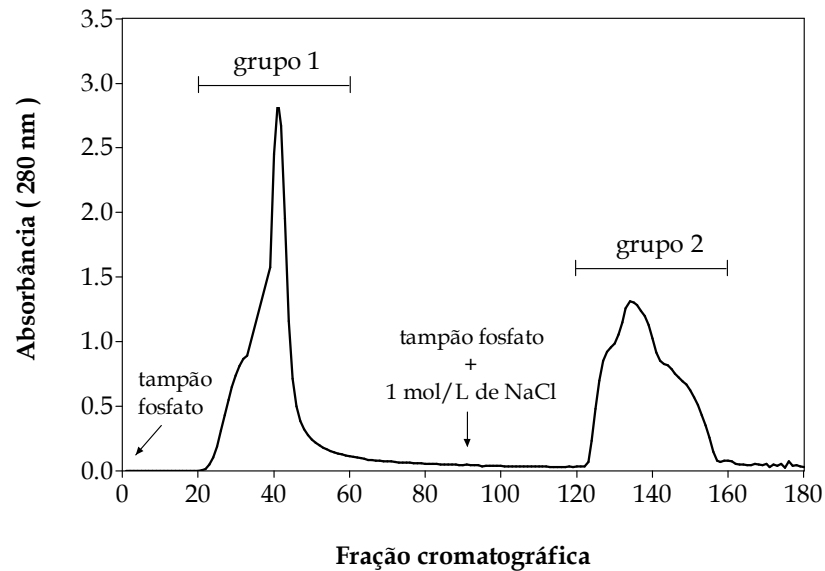


Figura 3.2. Perfil cromatográfico de soros imune rico em IgG anti-OVA, obtido em coluna de DEAE-celulose. Utilizou-se como fase móvel solução tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) para eluição do **grupo 1** (IgG total), e tampão fosfato (0,02 mol/L; pH 7,4) acrescido de 1 mol/L de NaCl para eluição do **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:** ovalbumina.

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

3.6.3.1. Análise eletroforética da fração IgG total do soro imune

A homogeneidade da preparação de IgG total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições dissociantes e não redutoras, segundo LAEMMLI, (1970).

Amostras da preparação de IgG e dos padrões de proteínas de alta e de média massa molecular foram diluídas em solução tampão Tris-HCl (0,06 mol/L; pH 6,8) contendo glicerol (20%), dodecil sulfato de sódio [(SDS) 4%] e azul de bromofenol. Posteriormente, essas amostras foram aplicadas no suporte para eletroforese, constituído de um gel de empilhamento (4%) e um gel de corrida (10%), ambos contendo SDS (10%). O processo de separação foi realizado sob corrente elétrica contínua de 40 mA, empregando-se solução tampão Tris-glicina, pH 8,3 (tris-hidroximetil-aminometano 0,05 mol/L, glicina 0,38 mol/L, SDS 0,1%) como fase móvel. O gel foi submetido a processo de coloração com Coomassie Brilliant Blue R (preparado a 0,25% (p/v) em uma mistura de metanol, ácido acético e água, na proporção 50:7:45) por 1 hora, seguido de descoloração com uma mistura de metanol, ácido acético e água na proporção 10:15:75. (Figura 3.3).

Foi construída uma curva de logaritmo da massa molecular ($\log M.M.$) em função do fator de retardamento (R_F) de cada proteína contida nos padrões de massa molecular, a partir da qual foi possível calcular a massa molecular aparente da proteína contida no primeiro pico da análise cromatográfica. A massa molecular obtida foi equivalente à da molécula de IgG, aproximadamente

142 KDa (JOHNSTONE; THORPE, 1987) (Figuras 3.3 e 3.4). Além disso, essa amostra apresentou uma banda única, indicando estar homogênea.

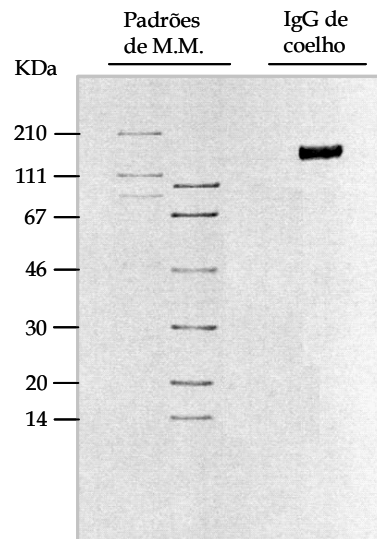


Figura 3.3. Análise eletroforética da fração IgG total do soro de coelhos imunizados com OVA. Os valores de massa molecular de alguns componentes das soluções-padrão de proteínas estão indicados na figura. **Abreviaturas:** **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina.

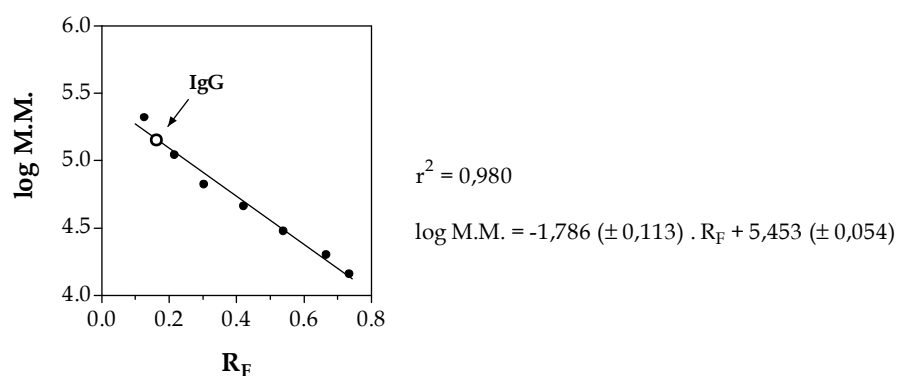


Figura 3.4. Curva de logaritmo da massa molecular ($\log M.M.$) em função do fator de retardamento (R_F) das proteínas separadas por eletroforese. Por meio da equação da reta de regressão linear foi possível determinar a M.M. aparente da IgG (142 KDa; círculo aberto, indicado pela seta), purificada por cromatografia de troca iônica. **IgG:** imunoglobulina da classe G.

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

Para se determinar a quantidade relativa de IgG anti-OVA na preparação de IgG total, e a sua habilidade de reagir com o antígeno (OVA), foi feita a análise por imunodifusão radial dupla, seguindo-se o método descrito por Ouchterlony (1958).

Inicialmente, uma solução de agar a 1,3% (preparado em PBS) foi depositada sobre lâminas de vidro. Após a solidificação, foram perfurados 63 poços, distribuídos simetricamente a uma distância de 1 cm um do outro. Nestes poços, foram aplicadas a amostra de IgG total (não diluída ou nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) e a solução de OVA a 1 mg/mL (não diluída ou nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). As diluições das soluções de anticorpo e de antígeno foram feitas em PBS. Após 24 horas em temperatura ambiente, o gel foi lavado com solução de NaCl (0,15 mol/L), seco em estufa a 37°C, e submetido a processo de coloração semelhante ao descrito no item 3.6.3.1.

As linhas coradas em azul indicam a formação do complexo antígeno-anticorpo insolúvel, resultante da reação entre a OVA e a IgG anti-OVA, confirmando a presença do anticorpo específico (Figura 3.5.). A partir da análise dessa figura pode-se sugerir que a provável proporção antígeno-anticorpo do ponto de equivalência é: anticorpo não diluído e antígeno diluído 1:8. Esta proporção foi utilizada como ponto de partida para a determinação quantitativa do ponto de equivalência da reação antígeno-anticorpo, conforme descrito a seguir.

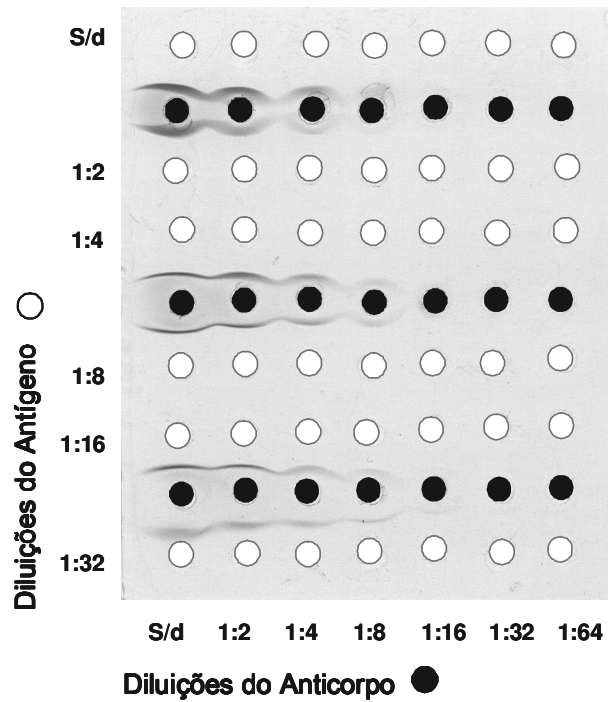


Figura 3.5. Imunodifusão radial dupla para avaliação da presença de IgG anti-OVA na preparação de IgG total, obtida após purificação de soro de coelhos imunizados com OVA. Foi utilizada uma lâmina de vidro recoberta com gel de agar a 1,3% (p/v) em PBS. Foram colocados nos poços amostras de IgG total purificada e de OVA (1 mg/mL), diluídas em diferentes proporções. **Abreviaturas:** **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina; **PBS:** solução salina tamponada com fosfato; **S/D:** não diluído.

Alíquotas de 100 μL da preparação de anticorpo não diluído foram adicionadas a 4 tubos contendo 100 μL do antígeno nas diluições sucessivas de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, preparadas em PBS (pH 7,4) a partir de uma solução de OVA a 1 mg/mL. As alíquotas foram incubadas por 1 hora a 37°C e depois por 24 horas a 4°C, centrifugadas a 15600g por 5 minutos em temperatura ambiente, lavadas por duas vezes com PBS, empregando-se as mesmas condições de centrifugação. Os sedimentos foram dissolvidos com NaOH 0,1 mol/L e diluídos em NaCl 0,15 mol/L para determinação da concentração de proteínas, por meio de leitura de absorbância em 280 nm. A maior concentração de proteínas, referentes aos ICs precipitados, foi obtida na proporção de antígeno diluído 1:8 e anticorpo não diluído (Figura 3.6).

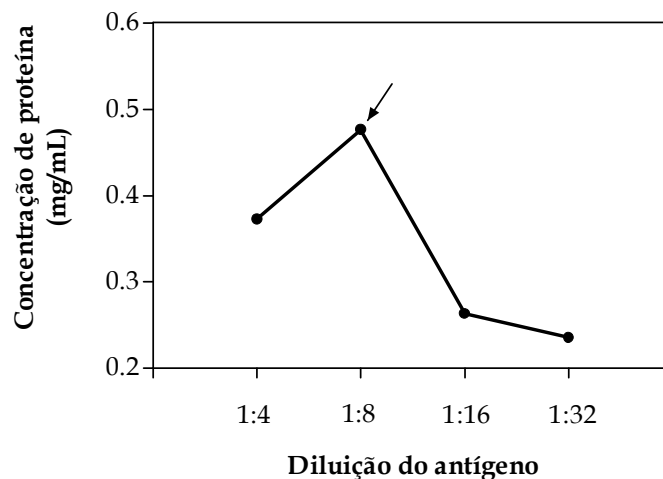


Figura 3.6. Quantificação de imunocomplexos precipitados formados de IgG anti-OVA (não diluído) e OVA (em diferentes diluições, preparadas a partir de uma solução a 1 mg/mL), através da determinação da concentração de proteínas pela medida da absorbância em 280 nm. A seta indica o ponto de equivalência, onde a proporção de OVA e de IgG anti-OVA leva à formação da quantidade máxima de imunocomplexos precipitados. **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina.

3.7. Preparo de fragmentos F(ab')₂ a partir de moléculas de IgG íntegra

Os fragmentos F(ab')₂ foram obtidos por digestão parcial de moléculas de IgG com pepsina, conforme descrito por Weir (1986). Para este procedimento, foi utilizada uma parte da preparação de IgG total (obtida no item 3.6).

Uma alíquota da preparação de F(ab')₂ foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, conforme descrito no item 3.6.3.1. Observou-se que a mesma estava pura, sem contaminação de IgG íntegra ou parcialmente digerida. Além disso, por meio da curva de log M.M. em função do R_F, o valor de M.M. aparente obtido para o fragmento F(ab')₂ foi de 91 KDa, que corresponde ao esperado para o mesmo (JOHNSTONE; THORPE, 1987).

3.8. Preparo de ICs

Os ICs foram preparados adicionando o antígeno (OVA) sobre o anticorpo [IgG ou fragmento F(ab')₂], nas proporções estabelecidas pelo ponto de equivalência. A mistura antígeno-anticorpo foi incubada a 37°C por 1 hora e depois a 4°C por 24 horas. O precipitado foi centrifugado a 12000g por 15 minutos a 4°C, lavado por duas vezes com PBS, sendo centrifugado nas mesmas condições, e finalmente suspenso em 1 mL de PBS.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão foi misturada com igual volume de NaOH 0,1 mol/L e diluída para 1 mL em PBS, para quantificação de proteínas através da leitura de absorvância em 280 nm.

3.9. Opsonização dos ICs

Os ICs formados com OVA e IgG ou fragmento F(ab')₂, conforme descrito no item 3.8, foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. Os sedimentos de cada tipo de IC foram adicionados de soro normal de coelho diluído 1:2 em tampão para fixação de complemento (WEIR, 1986) suplementado com 0,1% de gelatina, na proporção de 6 µL de soro diluído para cada mg de IC (GADD; REID, 1981).

Após incubação por 30 minutos a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com PBS, centrifugados nas mesmas condições, e suspensos em solução de Hanks (pH 7,2) para uma concentração de 120 µg/mL, levando-se em consideração a massa de proteína antes da adição do soro.

3.10. Ensaio em sistemas celulares

3.10.1. Padronização de ensaio para avaliação da atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase de neutrófilos

O método para avaliação da atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase baseia-se no consumo de O₂ pelos neutrófilos, monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com eletrodo do tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, USA).

Com o intuito de estabelecer as condições experimentais para o ensaio, os parâmetros avaliados foram a concentração de células e de IC IgG-OVA.

Como controle positivo foi utilizado o Ziops, preparado conforme descrito por Kabeya et al (2002). O Ziops consiste de uma preparação de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, recoberta (opsonizada) por anticorpos e proteínas do sistema complemento, que ativa o processo de fagocitose e o metabolismo oxidativo de neutrófilos (REMOLD-O'-DONNEL; PARENT, 1995). Dessa forma, o Ziops desencadeia a atividade do complexo da NADPH oxidase, aumentando o consumo de O₂ pelas células.

Uma alíquota da suspensão de neutrófilos (4-8 x 10⁶ células/mL) em solução de Hanks (pH 7,2) foi transferida para a câmara do oxígrafo e mantida a 37°C por 7 minutos, sob leve agitação magnética. O agente estimulador [IgG-OVA (60-240 µg/10⁶ células) ou Ziops (0,5 mg/10⁶ células)] ou o meio de reação (Hanks) foi adicionado e o consumo de O₂ foi medido por 8 minutos a 37°C. Os valores entre parênteses referem-se à concentração final de cada componente num volume de reação de 1,6 mL. A velocidade de consumo de O₂ foi determinada de acordo com Chance e Willians (1956).

Para uma concentração de 4x10⁶ células/mL (Figura 3.7.A), observou-se que a velocidade de consumo de O₂ na presença de IC IgG-OVA (60 µg/10⁶ células) foi um pouco maior do que na ausência deste (Hanks), porém a diferença entre eles não foi estatisticamente significante. Por outro lado, a velocidade de consumo de O₂ na presença de Ziops foi significativamente maior em relação à IC IgG-OVA.

Além disso, o aumento da concentração de IC IgG-OVA para a mesma quantidade de células (4x10⁶ células/mL) (Figura 3.7.B), bem como o aumento do número de células no meio de reação (Figura 3.7.C) não levou a um aumento

estatisticamente significativa da velocidade de consumo de O_2 . Esses resultados sugerem que, dentro das condições avaliadas, o sistema utilizado para medida da concentração de O_2 foi sensível o suficiente para detectar o aumento do consumo de O_2 pelos neutrófilos de coelho estimulados por Ziops mas não por IC IgG-OVA.

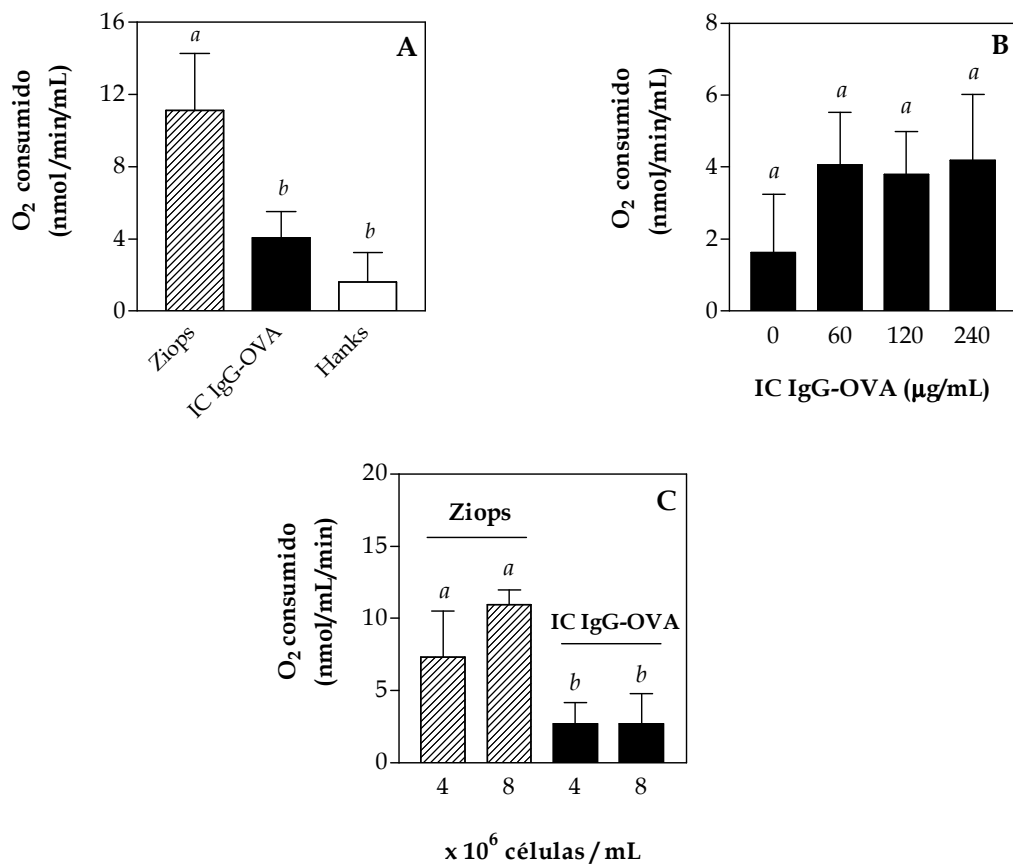


Figura 3.7. Medida da velocidade de consumo de O_2 por neutrófilos de coelho em diferentes condições experimentais. **A:** Neutrófilos (4×10^6 células/mL) estimulados por Ziops ($0,5 \text{ mg}/10^6$ células), IC IgG-OVA ($60 \text{ µg}/10^6$ células) ou Hanks. **B:** Neutrófilos (4×10^6 células/mL) estimulados com diferentes concentrações de IC IgG-OVA (0 – $240 \text{ µg}/10^6$ células). **C:** Diferentes concentrações de neutrófilos (4 ou 8×10^6 células/mL) estimulados por Ziops ($0,5 \text{ mg}/10^6$ células) ou IC IgG-OVA ($60 \text{ µg}/10^6$ células). **Hanks:** meio de reação (controle negativo). **Abreviaturas:** **IC IgG-OVA:** imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina; **Ziops:** zimosan opsonizado (controle positivo).

3.10.2. Avaliação da toxicidade das 3-fenilcumarinas sobre neutrófilos

A toxicidade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** foi avaliada através do ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán e da determinação da atividade da enzima LDH liberada pelos neutrófilos de coelho, seguindo-se as condições experimentais padronizadas por KABEYA (2002).

Alíquotas da suspensão de neutrófilos (1×10^6 células/mL) foram incubadas por 30 minutos a 37°C, na presença de dimetilsulfóxido [(DMSO); controle], Triton X-100 (0,2% v/v) ou das substâncias estudadas (3-fenilcumarinas ou **QUER**; 50 $\mu\text{mol/L}$) dissolvidas em DMSO. Os tubos de reação foram centrifugados a 755g a 4°C por 10 minutos. Os valores entre parênteses representam as concentrações finais, num volume de reação de 1 mL.

Os sedimentos de células foram suspensos em solução de Hanks contendo 0,1% de gelatina. Uma alíquota dessa suspensão foi misturada com igual volume de Azul de Tripán (preparado a 0,1% em NaCl 0,15 mol/L) e transferida para câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da contagem de 100 células.

A atividade da LDH no sobrenadante de cada amostra foi determinada utilizando-se o Kit LDH Liquiform (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brasil). De modo geral, uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao reagente de trabalho (piruvato + NADH + tampão específico), pré-aquecido a 37°C, e a absorbância em 340 nm foi medida durante 3 minutos a 37°C. A atividade da LDH nas amostras foi calculada de acordo com a recomendação do fabricante do kit. A toxicidade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em duplicata.

3.10.3. Avaliação da atividade biológica das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ R

A atividade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de coelho foi avaliada conforme descrito por LUCISANO-VALIM et al. (2002). Esta função celular foi avaliada através da medida da produção de O₂^{-•} por quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc^{PMN}) e da medida da produção total de EROs por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}) (Figura 3.8). A ativação específica do metabolismo oxidativo via receptores da classe Fc γ R foi realizada empregando-se IC IgG-OVA.

Os tubos de reação contendo neutrófilos (1 x 10⁶ células/mL), a substância-teste (3-fenilcumarinas ou **QUER**) ou DMSO (controle) e a sonda quimioluminescente [luminol (280 μ mol/L) ou lucigenina (150 μ mol/L)] foram incubados em banho-maria a 37°C por 3 minutos. A cada um deles foi adicionado IC IgG-OVA (60 μ g/mL) ou Hanks (controle) e, imediatamente a seguir, a QLlum^{PMN} ou a QLluc^{PMN} foram medidas em c.p.m. (fótons contados por minuto) durante 30 minutos a 37°C, em luminômetro Auto Lumat LB953 (EG&G Berthold, Alemanha). O luminol, a lucigenina, a **QUER** e as 3-fenilcumarinas foram preparados em DMSO. Os valores entre parênteses indicam as concentrações finais, num volume de reação de 0,8 mL.

A partir das curvas de QLluc^{PMN} ou QLlum^{PMN} em função do tempo (Figura 3.9.A) foram calculados os valores de área integrada (área sob a curva) de 0 a 30 minutos (Figuras 3.9.B e 3.9.C). No caso do ensaio de QLluc^{PMN}, este valor de área integrada representa a quantidade total de O₂^{-•} produzido em 30

minutos, e, no caso do ensaio de $QLlum^{PMN}$, a quantidade total de EROs produzidas neste mesmo intervalo de tempo (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

Esses valores de área integrada de $QLluc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição (% I) promovida pelas diferentes concentrações das substâncias analisadas, em relação aos respectivos controles (Figura 3.9.D), seguindo-se a fórmula:

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

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

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

AC : área integrada de $QLluc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$ do controle (DMSO)

Na seqüência, foram calculados os valores de CI_{50} , que é a concentração da substância estudada que inibe 50% da resposta biológica avaliada ($QLlum^{PMN}$ ou $QLluc^{PMN}$), por meio de regressão não linear (Figura 3.9.E). Esses valores de CI_{50} foram utilizados como parâmetro para comparação da atividade de cada substância com a **QUER**.

A atividade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em duplicata, sendo que as substâncias hidroxiladas e suas respectivas análogas acetoxiladas foram avaliadas no mesmo experimento.

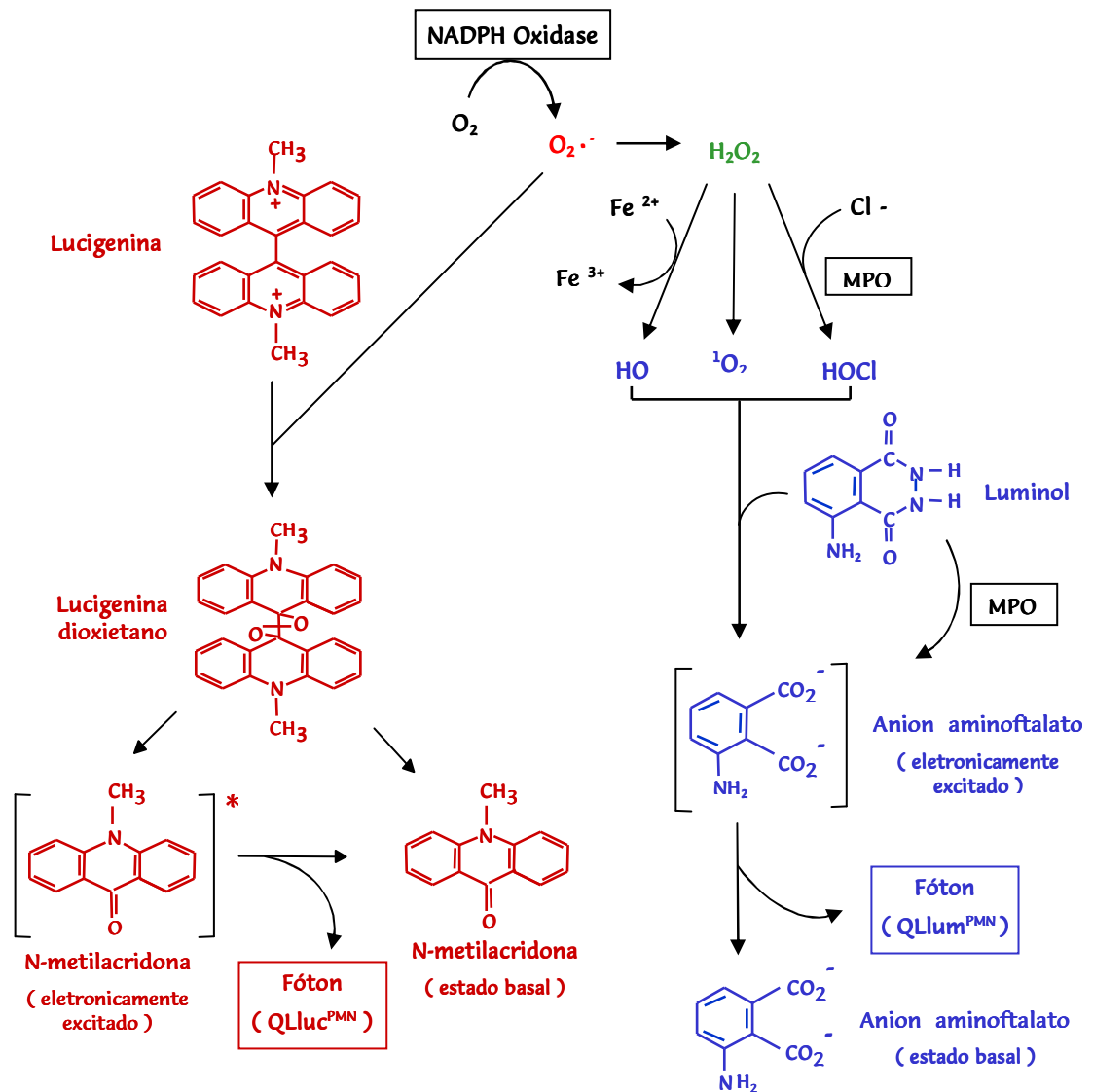


Figura 3.8. Representação simplificada da produção das principais EROs por neutrófilos estimulados, bem como da sua detecção por meio das sondas quimioluminescentes luminol e lucigenina. Em procedimentos experimentais, estas sondas são utilizadas separadamente. A ligação de estímulos aos receptores de membrana da célula leva à formação do complexo da NADPH oxidase, o qual converte oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este é convertido em H_2O_2 , que pode ser utilizado pela mieloperoxidase (MPO) para produção de ácido hipocloroso ($HOCl$) e participar de outras reações que levam à formação de diferentes produtos. As EROs derivadas do H_2O_2 podem ser detectadas pelo luminol, levando à produção da quimioluminescência dependente de luminol ($QLlum^{PMN}$; reações em azul), enquanto que o $O_2^{\bullet-}$ pode ser detectado pela lucigenina, levando à produção da quimioluminescência dependente de lucigenina ($QLuc^{PMN}$; reações em vermelho). Esquema elaborado a partir das reações descritas por Johnson, Varani e Smolen (1992) e Li, Zhu e Trush (1999).

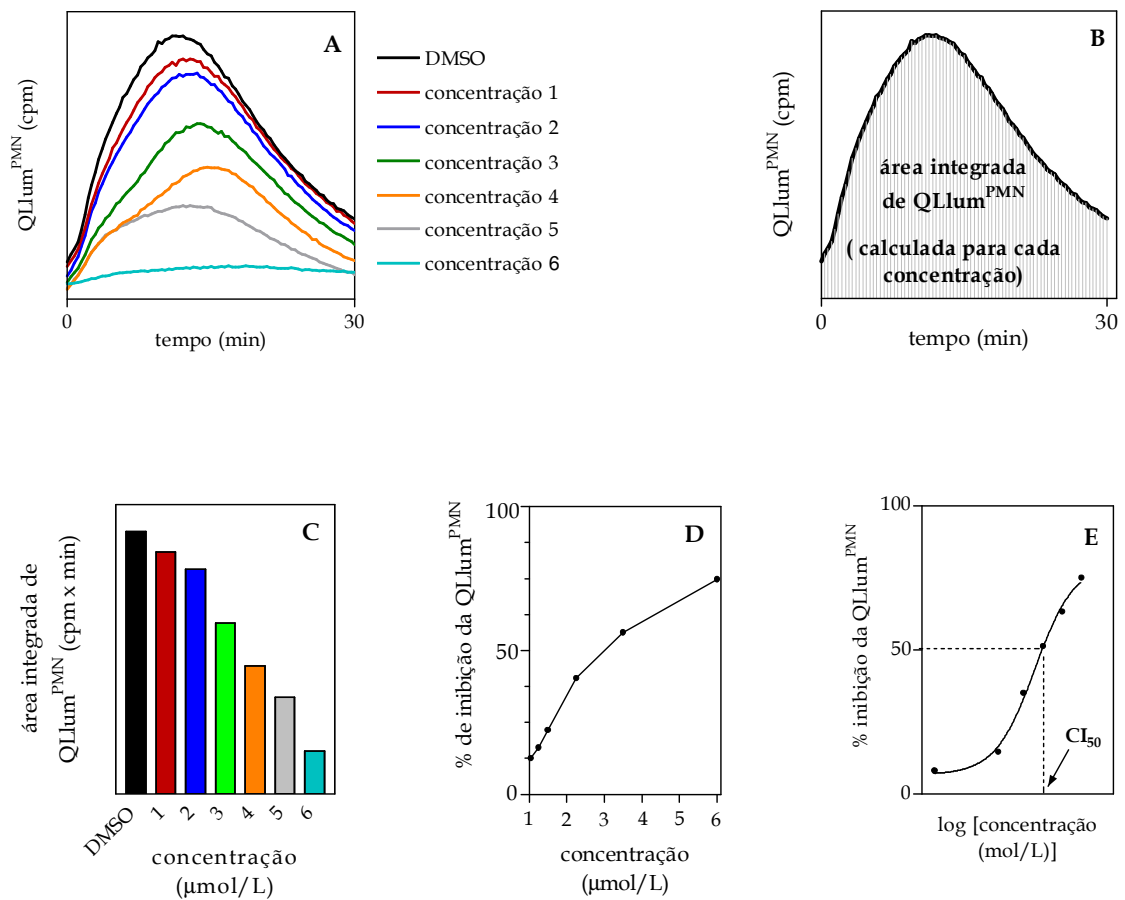


Figura 3.9. Representação simplificada das etapas envolvidas na obtenção dos resultados de avaliação da atividade das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. **A:** Medida de QLLum^{PMN} em função do tempo, produzida por neutrófilos estimulados com IC IgG-OVA, na presença de DMSO (controle) ou de seis concentrações das substância-teste. **B:** representação da área integrada de QLLum^{PMN} (área sob a curva), cujos valores são determinados para cada amostra (**gráfico C**) e posteriormente utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição da QLLum^{PMN} de cada concentração em relação ao controle (DMSO) (**gráfico D**). **E:** cálculo do valor de CI₅₀ de cada substância avaliada, por meio de regressão não-linear. **Abreviaturas:** CI₅₀: concentração que inibe 50% da resposta biológica; DMSO: dimetilsulfóxido; IC IgG-OVA: imunocomplexo formado de OVA e IgG anti-OVA; IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina; QLLum^{PMN}: quimioluminescência dependente de luminol.

3.10.4. Avaliação da atividade biológica das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR, em função do tempo de pré-tratamento

Os tubos de reação contendo neutrófilos (1×10^6 células/mL), a sonda quimioluminescente [luminol (280 μmol/L) ou lucigenina (150 μmol/L)] e a substância-teste (**QUER**, **C13**, **C13a** ou **C24a**) ou DMSO (controle) foram incubados a 37C durante diferentes intervalos de tempo (3, 15 e 30 minutos). A cada um deles foi adicionado IC IgG-OVA (60 μg/mL) ou Hanks (controle) e, imediatamente a seguir, a QLlum^{PMN} ou a QLluc^{PMN} foram medidas por 30 minutos a 37C.

As substâncias foram avaliadas em apenas uma concentração, próxima ao CI₅₀ (**C13** e **C13a**: 1 μmol/L; **C24a**: 0,5 μmol/L; **QUER**: 5 μmol/L para QLluc^{PMN} e 2,5 μmol/L para QLlum^{PMN}). As demais condições experimentais empregadas para este ensaio foram semelhantes às descritas no item 3.10.3.

3.10.5. Avaliação da atividade biológica das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR e/ou CR

A ativação específica do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de coelho via receptores das classes FcγR e/ou CR foi obtida com o uso de diferentes tipos de ICs, conforme especificado na Figura 3.10 (ALVES, 2000).

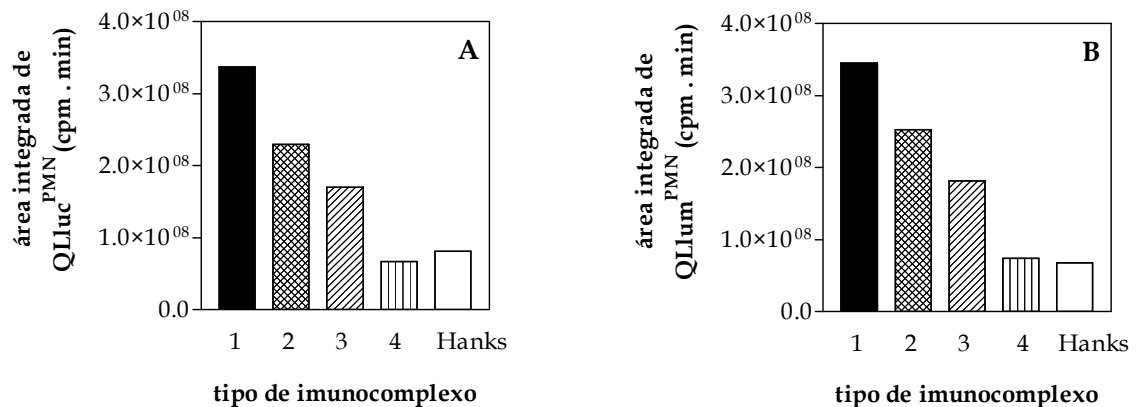
Os tubos de reação contendo neutrófilos (1×10^6 células/mL), a sonda quimioluminescente [luminol (280 μmol/L) ou lucigenina (150 μmol/L)] e a

substância-teste (**QUER, C13, C13a** ou **C24a**) ou DMSO (controle) foram incubados a 37°C por 3 minutos. A cada um deles foi adicionado um dos tipos de IC (60 µg/mL) ou Hanks (controle) e a QLLum^{PMN} ou a QLluc^{PMN} foram medidas por 30 minutos a 37°C. Cada substância-teste foi avaliada em três concentrações diferentes. As demais condições experimentais utilizadas, bem como a forma de análise dos resultados, foram semelhantes às descritas no item 3.10.3.

O padrão de ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de coelho observado para este modelo experimental está descrito de modo resumido a seguir. Os valores de área integrada de QLLum^{PMN} e de QLluc^{PMN}, na presença dos diferentes estímulos, são decrescentes na seguinte ordem: IgG-OVA/SC > IgG-OVA > F(ab')₂-OVA/SC > F(ab')₂-OVA = Hanks. Tendo em vista as classes de receptores estimulados, esta ordem pode ser expressa como: FcγR+ CR > FcγR > CR > IC que não se liga a receptor = meio de reação (Figura 3.10).

Quando o estímulo adicionado se liga a ambas as classes de receptores (IC IgG-OVA/SC), FcγR e CR, ocorre cooperação entre eles, levando a uma estimulação mais efetiva quando comparada a ativação mediada por apenas uma das classes separadamente. Entre as classes de receptores FcγR e CR, a ativação específica mediada pela primeira (IC IgG-OVA) desencadeia uma produção de EROs maior que a segunda [IC F(ab')₂-OVA/SC]. Isso se deve ao fato de que os componentes do sistema complemento auxiliam na fixação e ancoragem do IC opsonizado na membrana da célula fagocítica, mas isoladamente esses componentes têm uma baixa capacidade de estimular o

metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Os IC F(ab')₂-OVA não estimulam as células, uma vez que não possuem a porção Fc, nem componentes do sistema complemento; por isso a resposta celular na presença deste IC foi semelhante à do controle não estimulado (células + meio de reação).



Tipo de imunocomplexo		Classe de receptor de membrana
1	IC IgG-OVA/SC	FcγR e CR
2	IC IgG-OVA	FcγR
3	IC F(ab') ₂ -OVA/SC	CR
4	IC F(ab') ₂ -OVA	não interagem com as células
Hanks	controle	células + meio de reação

Figura 3.10. Medida da produção de EROs por neutrófilos de coelho estimulados por diferentes tipos de ICs, empregando-se ensaio de QLuc^{PMN} (**gráfico A**) e de QLum^{PMN} (**gráfico B**). Cada tipo de IC estimula as células por meio de diferentes classes de receptores de membrana. **Abreviaturas:** **CR:** receptor de complemento; **EROs:** espécies reativas de oxigênio; **F(ab')₂:** molécula de anticorpo com duas porções ligantes do antígeno e desprovida de Fc; **Fc:** fragmento cristalizável; **FcγR:** receptor para a porção Fc de IgG; **IC:** imunocomplexo; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina; **SC:** soro normal de coelho; **QLuc^{PMN}:** quimioluminescência dependente de lucigenina; **QLum^{PMN}:** quimioluminescência dependente de luminol.

3.10.6. Avaliação da atividade biológica das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre a fagocitose de ICs

O efeito da **QUER** e das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a** sobre a fagocitose de IC IgG-OVA por neutrófilos de coelho, mediada por receptores Fc γ R, foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de transmissão, empregando-se metodologia descrita por Oliveira et al. (2002). As três 3-fenilcumarinas foram selecionadas por terem sido significativamente mais efetivas que a **QUER** em inibir o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de coelho.

Este ensaio foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia – MG), e da técnica Maria Dolores Silva Ferreira, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto – SP).

O protocolo experimental está descrito de modo resumido a seguir. Todas as centrifugações foram feitas a 483g por 10 minutos a 4°C. As etapas de incubação foram realizadas na presença das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** ou **C24a** (25 μ mol/L), ou da **QUER** (50 μ mol/L) ou DMSO (controle).

Inicialmente, a suspensão de neutrófilos (1×10^7 células/mL) foi incubada com IC IgG-OVA por 40 minutos a 4°C. Essa suspensão foi então centrifugada, lavada com PBS, e o sedimento foi suspenso em solução de Hanks e adicionado de IgG de carneiro anti-IgG de coelho, conjugado com ouro coloidal. Após incubação por 30 minutos a 4°C, o material foi centrifugado, lavado com PBS, suspenso em solução de Hanks, incubado por 20 minutos a 37°C e centrifugado.

O sedimento foi tratado com fixador de Karnovsky e tetróxido de ósmio (previamente reduzido com ferrocianeto de potássio), lavado com PBS e centrifugado. O sedimento celular foi pré-incluído em blocos de agar, desidratado em gradiente de etanol, lavado em gradiente de tolueno, e finalmente incluído em resina XL112. Esses blocos foram utilizados para a obtenção de cortes ultrafinos destinados análise por microscopia eletrônica de transmissão (microscópio EM-208, Philips).

3.11. Ensaios em sistemas não-celulares

3.11.1. Avaliação da atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas frente ao radical livre DPPH

A atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas e da **QUER** frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi avaliada seguindo-se o método descrito por BLOIS (1958) e modificado por RODRIGUES et al. (2002).

A solução de DPPH (100 $\mu\text{mol/L}$), preparada em etanol, foi misturada com solução tampão acetato de sódio (40 mmol/L , pH 5,5) na proporção de 6:4. A absorbância inicial em 510 nm foi medida (espectrofotômetro DU-70, Beckman, USA) e a substância-teste (**QUER** ou 3-fenilcumarinas, de 0-50 $\mu\text{mol/L}$) foi adicionada. Após 5 minutos de reação em temperatura ambiente (25°C), foi medida a absorbância final. Os valores entre parênteses são referentes às concentrações finais, num volume de reação de 1 mL. A atividade de todas as

substâncias foi avaliada num mesmo experimento, em três dias diferentes, com medidas em duplicata.

A porcentagem de DPPH reduzido foi calculada segundo a equação:

$$\text{DPPH reduzido (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{INICIAL}} - \text{Absorbância}_{\text{FINAL}}}{\text{Absorbância}_{\text{INICIAL}}} \times 100$$

3.11.2. Avaliação da atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas empregando a reação HRP-H₂O₂-luminol

A enzima *horseradish peroxidase* (HRP), na presença H₂O₂, é capaz de oxidar o luminol, levando produção de quimioluminescência (DURE; CORMIER, 1964) (Figura 3.11). A atividade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** sobre a QL^{HRP}, ou seja, a quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol, foi avaliada seguindo-se a metodologia descrita por Krol et al. (1994).

As soluções de H₂O₂ e de HRP foram preparadas em tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 7,4) e as soluções das 3-fenilcumarinas, de **QUER** e de luminol foram preparadas em DMSO. As concentrações finais de cada componente da reação estão indicadas entre parênteses. O volume de reação foi de 0,5 mL.

Foram preparados tubos de reação contendo: solução de H₂O₂ (50 µmol/L), luminol (140 µmol/L) e a substância-teste (3-fenilcumarina ou **QUER**) ou DMSO (controle). Estes foram incubados em banho-maria a 30°C por 3 minutos. Procedeu-se à adição da solução de HRP (0,2 UI/mL) a cada um deles, homogeneização e, imediatamente a seguir, leitura da QL^{HRP} por 20 minutos a 30°C em luminômetro.

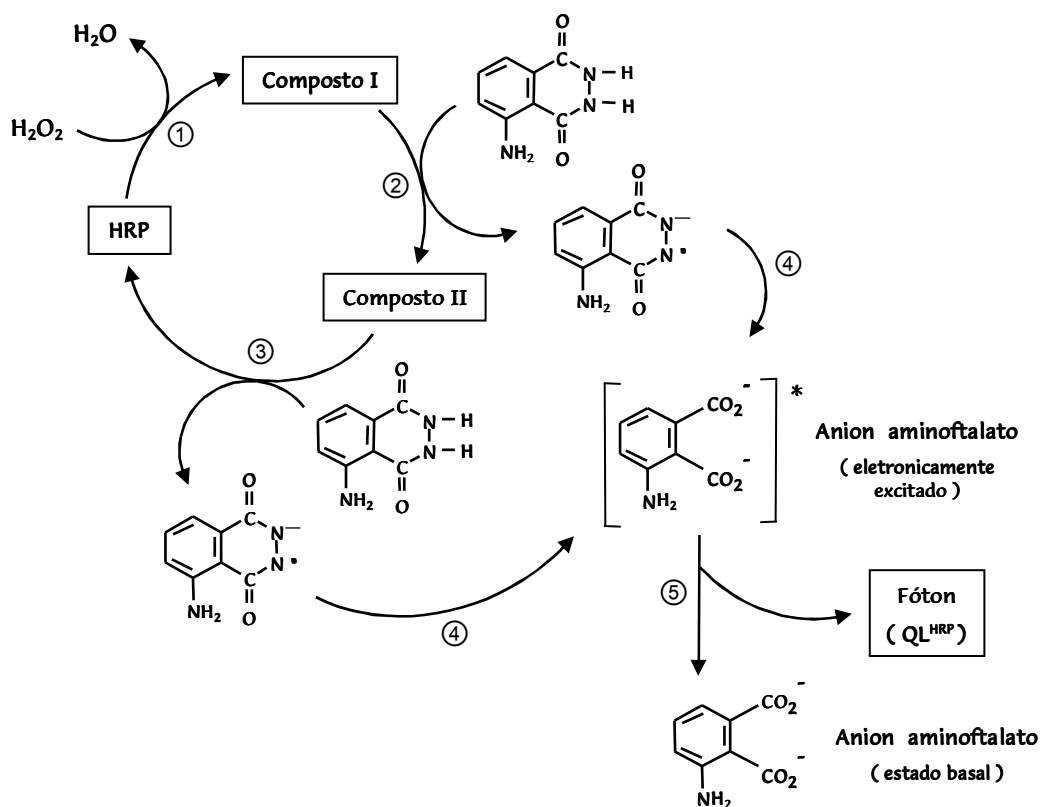


Figura 3.11. Esquema simplificado da produção de quimioluminescência pela reação HRP-H₂O₂-luminol. **(1):** O H₂O₂ é convertido em água pela HRP (*horseradish peroxidase*), gerando o intermediário composto I. **(2):** O composto I oxida o luminol, produzindo o composto II. **(3):** Oxidação do luminol pelo composto II, regenerando o sítio catalítico da enzima. **(4):** As reações 2 e 3 produzem luminol na forma de radical livre, que gera o ânion aminoftalato no estado eletronicamente excitado. **(5):** liberação fótons pelo intermediário quimicamente instável, ao retornar para o estado basal. Esquema elaborado a partir das reações descritas por Thorpe e Kricka (1986) e Misra e Squatrito (1982).

Para cada tubo de reação foi feita a leitura da QL^{HRP} por 20 minutos, obtendo-se curvas de QL^{HRP} (em c.p.m.) em função do tempo (em minutos). Para cada curva de QL^{HRP} determinou-se o valor da área integrada de 0 a 20 minutos, que foram empregados para o cálculo dos valores de porcentagem de inibição ou aumento da QL^{HRP} de cada concentração em relação ao controle.

A atividade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em duplicata. Foram determinados os valores de CI_{50} para as substâncias que inibiram a QL^{HRP} de modo dependente da concentração.

3.12. Avaliação da interação das 3-fenilcumarinas com a HRP por *docking*

O estudo de modelagem molecular por *docking* foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Carlos H. T. P. Silva e da Profa. Dra. Mônica T. Pupo, ambos do laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP.

As interações das 3-fenilcumarinas com a HRP foram simuladas utilizando o programa GOLD 3.0 (VERDONK et al., 2003), o qual realiza *docking* flexível com o uso de um algoritmo genético. Foram empregados parâmetros pré-estabelecidos, otimizados para um grupo de 305 diferentes complexos com estruturas resolvidas no *Protein Data Bank* (PDB), e uma população de 100 confórmeros, 100.000 operações, 95 mutações e 95 cruzamentos.

Os cálculos de *docking* foram realizados dentro de uma esfera com raio de 15 e origem no nitrogênio Epsilon 2 ($N\epsilon 2$) da His42 da estrutura da HRP (código no PDB 1H5G) (BERGLUND et al., 2002). Esta estrutura apresentou a maior resolução (1.57 Å) dentre todas as HRP com coordenadas depositadas no PDB. Este resíduo foi utilizado porque está situado próximo ao sítio ativo da HRP.

As dez orientações de maior escore obtidas para cada composto foram selecionadas através de GoldScore. Baseado nesta função, GOLD classifica as

orientações das moléculas em ordem decrescente de afinidade (os escores) com o sítio ativo do receptor. Antes dos cálculos de *docking* e após a remoção das águas cristalográficas do interior do sítio ativo, os átomos de hidrogênio das cadeias laterais dos resíduos foram adicionados e orientados por minimização constrangida, onde apenas os átomos de hidrogênio são deixados livres. As cargas e potenciais atômicos do campo de força AMBER foram adicionados à estrutura da proteína utilizando-se o programa Insight II (INSIGHT..., 2000).

A pesquisa conformacional foi realizada com as vinte 3-fenilcumarinas e a **QUER**, utilizando o método sistemático para moléculas com cinco ou menos ligações flexíveis, e o método MONTE CARLO para as moléculas mais complexas, com o modelo de mecânica molecular MMFF (campo de fora MERCK). As estruturas foram então completamente otimizadas em nível de fase gasosa a B3LYP/6-31G*, usando o programa Spartan'04 versão 1.0.3 (SPARTAN..., 2005).

3.13. Análise dos dados

Os dados obtidos foram processados por meio do programa GraphPad Prism 3.00 (GRAPH..., 1999) e analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados significantes.

4. Resultados

4.1. Ensaio em modelos experimentais celulares, empregando neutrófilos de coelho

4.1.1. Avaliação da toxicidade das 3-fenilcumarinas sobre neutrófilos

A toxicidade das 3-fenilcumarinas e da **QUER** sobre neutrófilos de coelho foi avaliada na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, através dos ensaios de exclusão ao corante Azul de Tripán e da determinação da atividade da enzima citoplasmática LDH liberada no sobrenadante.

Observou-se que quando as células foram incubadas na presença das substâncias avaliadas, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular e na porcentagem de LDH liberada em relação ao controle (DMSO) (Tabela 4.1). Além disso, os valores de atividade da LDH nas amostras e no controle negativo foram significativamente menores ($p < 0,001$; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett) que os obtidos para o controle positivo, onde há lise total das células com 0,2% de Triton X-100 (dados não apresentados).

Portanto, dentro das condições experimentais empregadas, não foi observada toxicidade significativa das 3-fenilcumarinas e da **QUER** sobre os neutrófilos de coelho.

Tabela 4.1. Viabilidade dos neutrófilos de coelho após tratamento com as 3-fenilcumarinas ou quercetina, na concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$. ^(a)

Substância ^(b)	Viabilidade (%) ^(c)	LDH liberada (% do total) ^(d)
DMSO	92,9 \pm 3,4	12,4 \pm 2,0
C1	96,0 \pm 2,0	11,9 \pm 0,9
C6	93,8 \pm 1,9	9,0 \pm 1,1
C6a	95,5 \pm 1,9	11,4 \pm 0,7
C11	94,3 \pm 2,6	11,1 \pm 0,8
C11a	94,3 \pm 2,5	13,8 \pm 2,1
C13	93,2 \pm 4,5	15,3 \pm 1,9
C13a	95,0 \pm 2,6	11,9 \pm 1,0
C15	90,3 \pm 2,2	17,1 \pm 0,4
C18	92,3 \pm 3,2	10,7 \pm 2,2
C18a	93,8 \pm 1,0	11,3 \pm 0,9
C19	93,8 \pm 0,5	11,2 \pm 1,4
C19a	94,0 \pm 1,8	9,3 \pm 1,6
C20	89,5 \pm 3,9	18,3 \pm 2,3
C20a	92,5 \pm 2,4	11,6 \pm 2,0
C23	92,8 \pm 4,0	11,9 \pm 2,5
C23a	93,3 \pm 4,1	9,3 \pm 4,0
C24	92,0 \pm 2,2	10,5 \pm 0,8
C24a	88,8 \pm 4,9	20,7 \pm 1,8
C25	94,8 \pm 1,5	9,8 \pm 2,4
C25a	90,3 \pm 3,3	14,6 \pm 1,3
QUER	93,0 \pm 4,0	10,9 \pm 2,6

(a) As células foram incubadas na presença das 3-fenilcumarinas, QUER ou DMSO (controle) por 30 minutos a 37°C.

(b) Estruturas químicas representadas na Figura 3.1.

(c) Determinada através do ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, baseada na contagem de 100 células. Média \pm DP de três experimentos, com medidas em duplicata.

(d) Valor calculado em relação a um controle positivo (100% de lise), onde as células foram lisadas com 0,2% de Triton X-100. Média \pm DP de três experimentos, com medidas em duplicata.

Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; DP: desvio padrão; QUER: quercetina.

4.1.2. Efeito das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ R

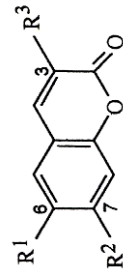
4.1.2.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 μ mol/L

O efeito das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados com IC IgG-OVA foi avaliado através da medida da QLlum^{PMN} e da QLluc^{PMN}. Em função do grande número de 3-fenilcumarinas a serem testadas neste trabalho, foi feita uma avaliação preliminar da atividade biológica dessas substâncias, na concentração de 50 μ mol/L.

Foram consideradas ativas as substâncias que promoveram inibição da QLlum^{PMN} ou da QLluc^{PMN} maior que 50%. De acordo com esse critério, as 3-fenilcumarinas **C1** e **C15** não tiveram atividade significativa sobre a QLluc^{PMN}, e as 3-fenilcumarinas **C1**, **C6**, **C6a**, **C11**, **C11a**, **C15**, **C18** e **C19** não tiveram atividade significativa sobre a QLlum^{PMN} (Tabela 4.2).

Posteriormente, a atividade inibitória das substâncias classificadas como ativas foi avaliada na concentração de 5 μ mol/L (Tabela 4.2), para determinar as faixas de concentração a serem empregadas para o estudo da atividade biológica dessas substâncias em função da concentração.




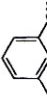
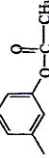
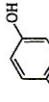
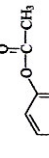

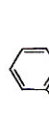
Tabela 4.2. Efeito inibitório das 3-fenilumarinas, expresso em porcentagem, sobre a quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}) ou de lucigenina (QLluc^{PMN}) produzida por neutrófilos estimulados por imunocomplexos. ^(a)



código	Substância			QLluc ^{PMN} (b)		QL lum ^{PMN} (b)	
	R ¹	R ²	R ³	50 µmol/L	5 µmol/L	50 µmol/L	5 µmol/L
C1	H	H		5,7 ± 14,0	n.d.	10,1 ± 3,4	n.d.
C6	OH	H		83,5 ± 6,5	32,6 ± 9,3	23,2 ± 1,5	n.d.
C6a	OCOCH ₃	H		68,0 ± 0,6	37,2 ± 2,5	13,7 ± 8,8	n.d.
C11	H	OH		79,4 ± 1,6	23,6 ± 9,7	17,5 ± 6,8	n.d.
C11a	H	OCOCH ₃		40,0 ± 1,5	22,4 ± 9,3	7,9 ± 6,9	n.d.
C13	OH	OH		99,6 ± 0,1	95,2 ± 0,6	99,8 ± 0,1	96,4 ± 0,1
C13a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		99,0 ± 0,3	95,2 ± 0,1	99,4 ± 0,1	97,5 ± 0,5


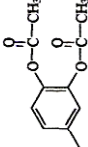

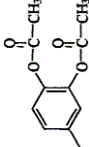
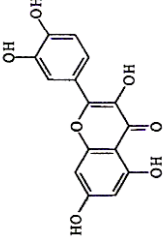
(continua)

(continuação)

código	Substância			QL _{luc} ^{PMN (b)}		QL _{lum} ^{PMN (b)}	
	R ¹	R ²	R ³	50 µmol/L	5 µmol/L	50 µmol/L	5 µmol/L
	C15	H	H		27,9 ± 5,4	n.d.	9,0 ± 6,0
C18	OH	H		83,5 ± 1,3	17,8 ± 1,8	21,8 ± 5,1	n.d.
C18a	OCOCH ₃	H		80,5 ± 0,6	27,5 ± 4,9	50,5 ± 0,2	18,3 ± 2,2
C19	OH	H		94,1 ± 0,9	32,6 ± 2,7	31,7 ± 5,4	n.d.
C19a	OCOCH ₃	H		82,1 ± 0,1	54,9 ± 5,1	66,3 ± 2,1	14,5 ± 2,1
C20	OH	H		95,7 ± 0,4	50,8 ± 0,6	69,8 ± 0,6	30,5 ± 13,8
C20a	OCOCH ₃	H		92,5 ± 0,6	67,6 ± 8,4	60,3 ± 4,0	20,4 ± 4,9
C25	OH	H		99,9 ± 0,1	85,3 ± 0,2	99,0 ± 0,1	80,6 ± 4,3
C25a	OCOCH ₃	H		96,5 ± 0,1	76,2 ± 3,3	94,6 ± 0,1	68,5 ± 0,1

(continua)

(continuação)

código	Substância			QLluc ^{PMN} (b)		QLlum ^{PMN} (b)	
	R ¹	R ²	R ³	50 µmol/L	5 µmol/L	50 µmol/L	5 µmol/L
C23	OH	H		98,7 ± 0,6	56,6 ± 2,2	99,2 ± 0,1	65,9 ± 3,3
C23a	OCOCH ₃	H		97,5 ± 0,3	86,7 ± 4,1	92,3 ± 0,1	92,3 ± 0,1
C24	OH	OH		94,9 ± 0,9	36,7 ± 0,6	92,4 ± 1,6	24,2 ± 0,1
C24a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		99,9 ± 0,1	99,5 ± 0,1	99,9 ± 0,1	99,7 ± 0,1
QUER				99,9 ± 0,1	59,3 ± 0,1	99,9 ± 0,1	89,3 ± 2,1

(a) Quimioluminescência produzida por neutrófilos de coelho estimulados via receptores FcγR, com o uso de IC IgG-OVA.

(b) Valores expressos como média ± DP da porcentagem de inibição da QLlum^{PMN} ou da QLluc^{PMN} em relação ao controle (DMSO), para dois experimentos, com medidas em duplicata. n.d.: medida não realizada, pois não foi observado efeito significativo na concentração de 50µmol/L.

Abreviaturas: DP: desvio padrão; **DMSO:** dimetilsulfóxido; **FcγR:** receptores para porção Fc de IgG; **IC IgG-OVA:** imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina; **QUER:** quercetina; **QLluc^{PMN}:** quimioluminescência dependente de lucigenina; **QLlum^{PMN}:** quimioluminescência dependente de luminol.

4.1.2.2. Avaliação da atividade biológica em função da concentração

A atividade biológica das 3-fenilcumarinas consideradas ativas (conforme avaliação preliminar descrita no item 4.1.2.1) e da **QUER** foi avaliada em seis concentrações diferentes, para o estudo da relação entre a concentração dessas substâncias e o efeito biológico de inibição da $QLluc^{PMN}$ ou $QLlum^{PMN}$, e também para a determinação dos valores de CI_{50} .

Um exemplo do efeito de diferentes concentrações da 3-fenilcumarina **C18a** sobre a $QLluc^{PMN}$ e a $QLlum^{PMN}$ está representado na Figura 4.1., onde se observa que os valores de $QLluc^{PMN}$ e de $QLlum^{PMN}$ em função do tempo (Figura 4.1.A e C) e as respectivas áreas integradas de $QLluc^{PMN}$ e de $QLlum^{PMN}$ (Figura 4.1.B e D) diminuem com o aumento da concentração da substância. Os formatos dos perfis de $QLluc^{PMN}$ e de $QLlum^{PMN}$ em função do tempo para todas as substâncias estudadas foram semelhantes aos representados na Figura 4.1, mas os valores absolutos de $QLluc^{PMN}$ e de $QLlum^{PMN}$ e os respectivos valores de área integrada foram diferentes para cada substância.

As 3-fenilcumarinas avaliadas inibiram a $QLluc^{PMN}$ (Figura 4.2) e a $QLlum^{PMN}$ (Figura 4.3) de modo dependente da concentração. Os valores de porcentagem de inibição da $QLluc^{PMN}$ e da $QLlum^{PMN}$ em função da concentração dessas substâncias foram empregados para o cálculo dos respectivos CI_{50} (Tabela 4.3), que foi o parâmetro utilizado para a comparação da atividade das 3-fenilcumarinas com a **QUER**. As características estruturais relacionadas ao efeito inibitório das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados via receptores da classe $Fc\gamma R$, avaliado pela inibição da $QLluc^{PMN}$ e da $QLlum^{PMN}$, estão descritas no item 4.1.2.3.

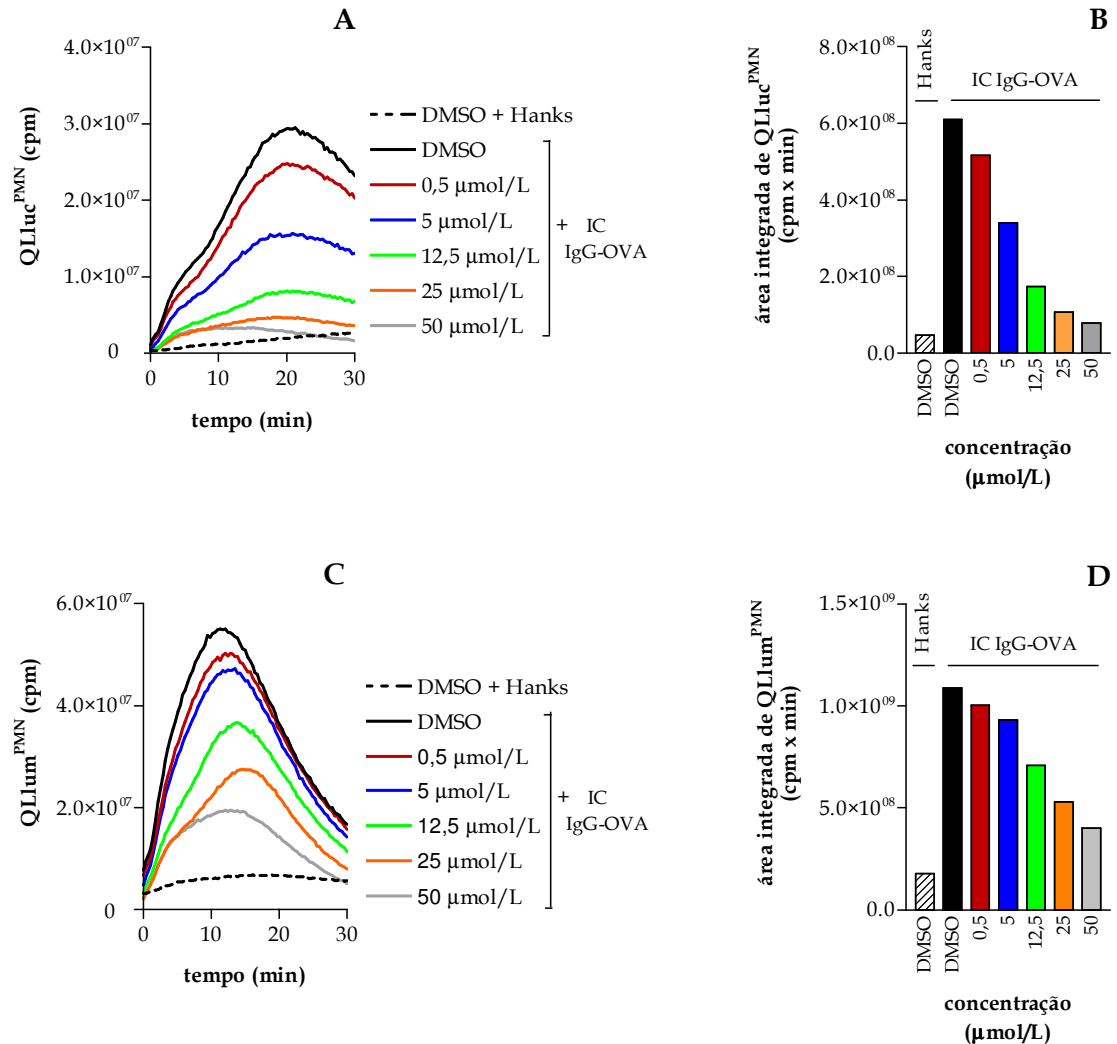


Figura 4.1. Inibição promovida por diferentes concentrações da 3-fenilcumarina **C18a** sobre a quimioluminescência gerada por neutrófilos de coelho estimulados via receptores da classe **FcγR**, com o uso de IC IgG-OVA. **(A):** Perfil de QLIuc^{PMN} em função do tempo. **(B):** valores de área integrada de QLIuc^{PMN}. **(C):** Perfil de QLIum^{PMN} em função do tempo. **(D):** valores de área integrada de QLIum^{PMN}. Gráficos representativos de uma medida experimental. **Abreviaturas:** **DMSO:** dimetilsufóxido; **FcγR:** receptor para porção Fc de IgG; **IC IgG-OVA:** imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina; **QLIuc^{PMN}:** quimioluminescência dependente de lucigenina; **QLIum^{PMN}:** quimioluminescência dependente de luminol.

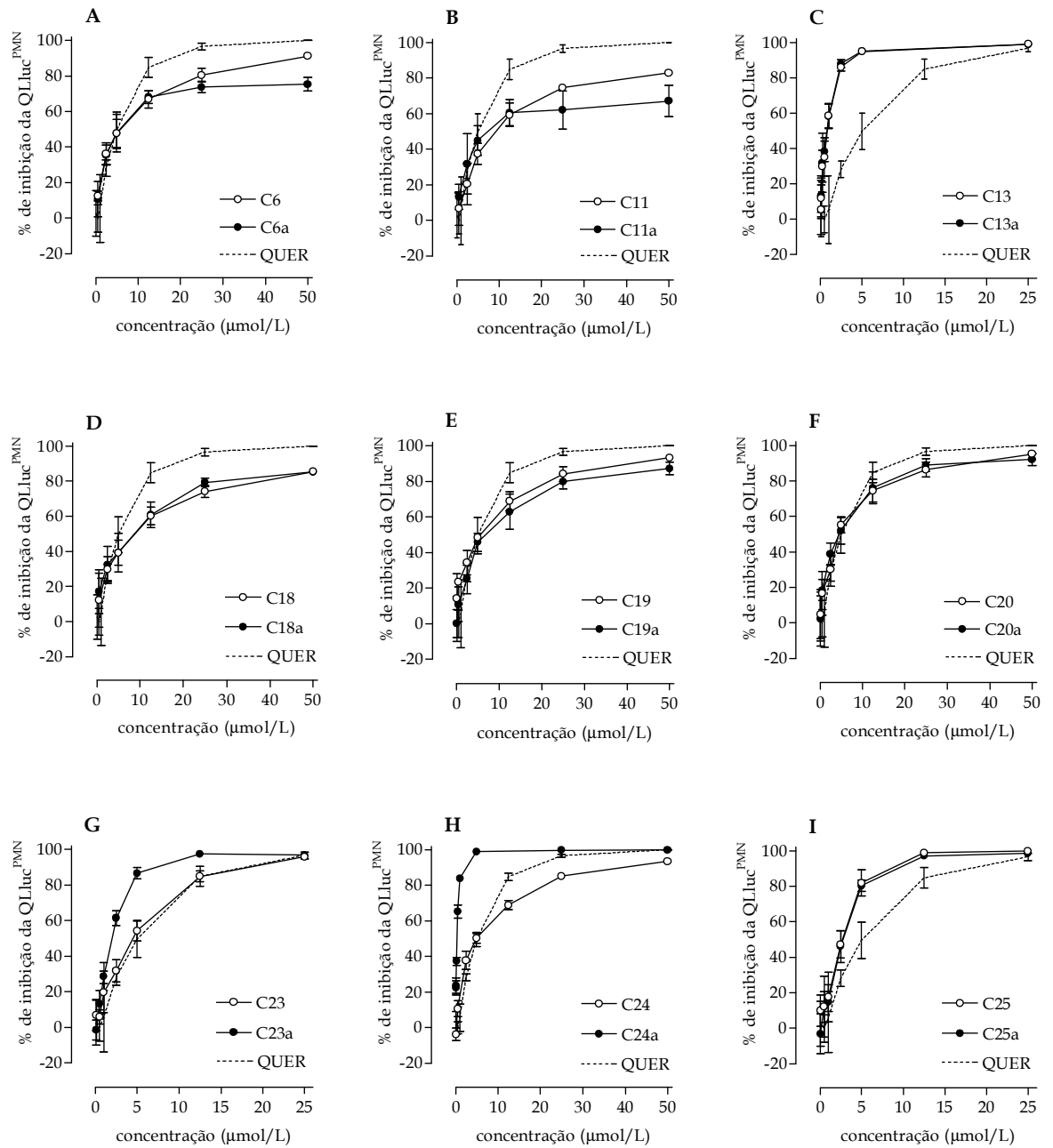


Figura 4.2. Curvas de porcentagem de inibição da $QLuc^{PMN}$ em função da concentração das 3-fenilcumarinas comparadas com a **QUER** (linha pontilhada) (**gráficos A - I**). A $QLuc^{PMN}$ foi produzida por neutrófilos de coelho estimulados via receptores $Fc\gamma R$, com o uso de IC IgG-OVA. Valores expressos como média \pm DP de três experimentos, com medidas em duplicata. **Abreviaturas:** DP: desvio padrão; $Fc\gamma R$: receptor para porção Fc de IgG; IC IgG-OVA: imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina; $QLuc^{PMN}$: quimioluminescência dependente de lucigenina; **QUER**: quercetina.

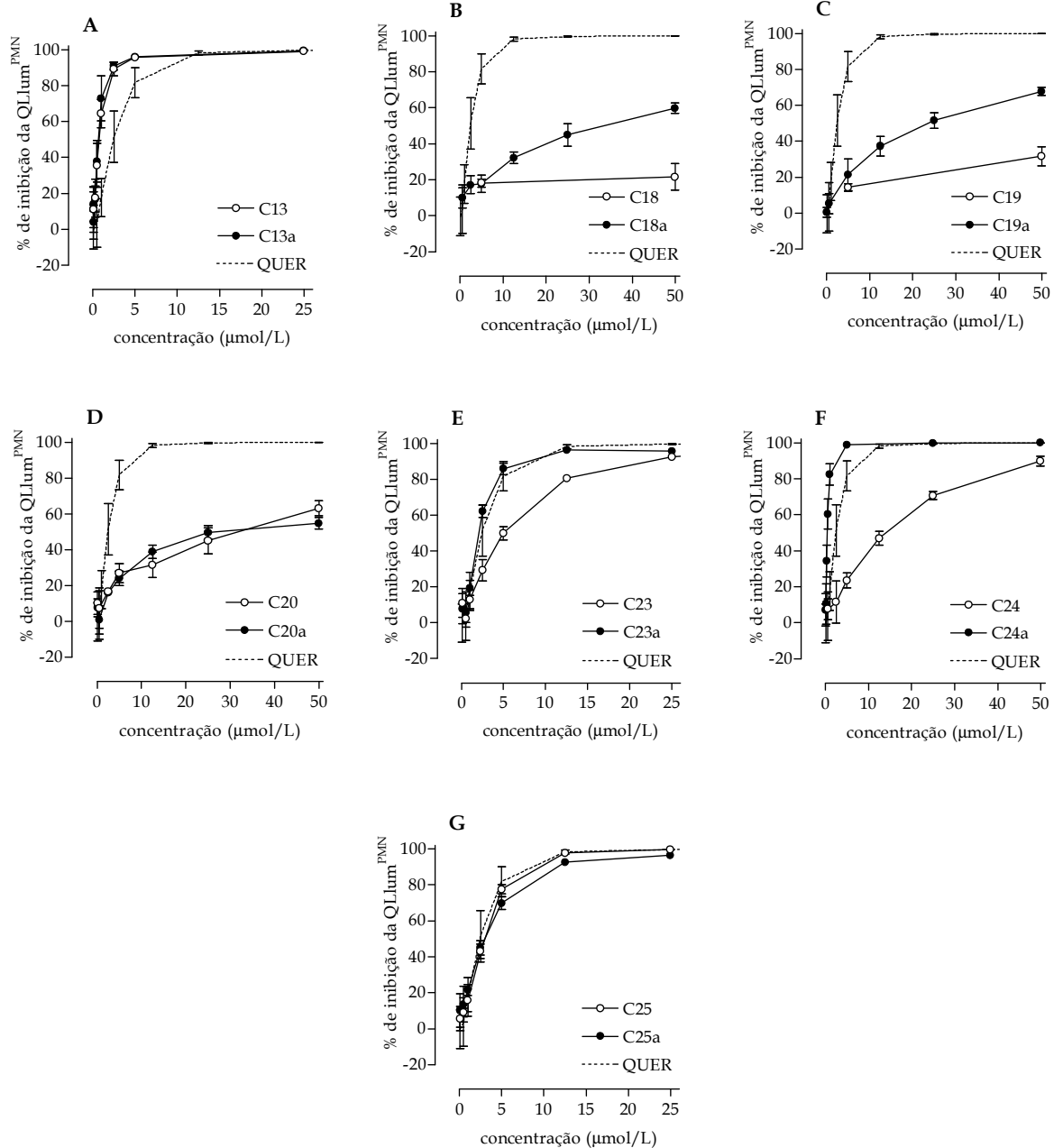
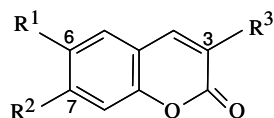


Figura 4.3. Curvas de porcentagem de inibição da $QLlum^{PMN}$ em função da concentração das 3-fenilcumarinas comparadas com a QUER (linha pontilhada) (gráficos A – G). A $QLlum^{PMN}$ foi produzida por neutrófilos de coelho estimulados via receptores $Fc\gamma R$, com o uso de IC IgG-OVA. Valores expressos como média \pm DP de três experimentos, com medidas em duplicata. **Abreviaturas:** DP: desvio padrão; $Fc\gamma R$: receptor para porção Fc de IgG; IC IgG-OVA: imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina; $QLlum^{PMN}$: quimioluminescência dependente de luminol; QUER: quercetina.


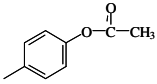

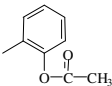
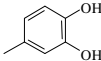
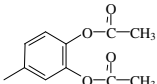
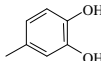
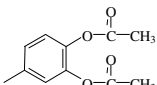
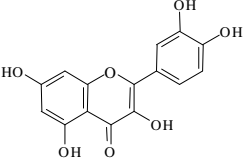
Tabela 4.3 – Concentração das 3-fenilcumarinas que promoveu 50% de inibição (CI_{50}) da quimioluminescência dependente de luminol (QLlum^{PMN}) ou de lucigenina (QLlum^{PMN}), produzida por neutrófilos estimulados via receptores da classe FcγR. ^(a)



código	Substância			CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ^(b)	
	R ¹	R ²	R ³	QLluc ^{PMN}	QL lum ^{PMN}
C1	H	H		> 50	> 50
C6	OH	H		5,65 ± 1,70	> 50
C6a	OCOCH ₃	H		5,39 ± 1,61	> 50
C11	H	OH		8,56 ± 1,84 **	> 50
C11a	H	OCOCH ₃		7,28 ± 3,49 *	> 50
C13	OH	OH		0,73 ± 0,12 **	0,72 ± 0,18 *
C13a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		0,69 ± 0,18 **	0,66 ± 0,13 *
C15	H	H		> 50	> 50
C18	OH	H		8,04 ± 2,62 **	> 50
C18a	OCOCH ₃	H		7,37 ± 2,32 *	31,23 ± 5,15 **
C19	OH	H		5,20 ± 1,08	> 50
C19a	OCOCH ₃	H		6,94 ± 1,65	21,70 ± 4,17 **

(continua)

(continuação)

código	Substância			CI ₅₀ (μmol/L) ^(b)	
	R ¹	R ²	R ³	QLluc ^{PMN}	QL lum ^{PMN}
C20	OH	H		4,35 ± 1,01	29,56 ± 7,65 **
C20a	OCOCH ₃	H		4,03 ± 0,53	27,40 ± 4,98 **
C25	OH	H		2,54 ± 0,55	2,80 ± 0,22
C25a	OCOCH ₃	H		2,59 ± 0,38	2,86 ± 0,32
C23	OH	H		4,42 ± 0,71	4,95 ± 0,54
C23a	OCOCH ₃	H		1,77 ± 0,14 *	2,03 ± 0,18
C24	OH	OH		5,22 ± 1,57	13,45 ± 1,27 **
C24a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		0,36 ± 0,08 **	0,39 ± 0,07 *
QUER				4,67 ± 0,84	2,41 ± 0,66

(a) QLlum^{PMN} e QLluc^{PMN} foi produzida por neutrófilos de coelho estimulados via receptores da classe FcγR, com o uso de IC IgG-OVA.

(b) Valores expressos como média ± DP de três experimentos, com medidas em duplicata.

Análise estatística: p<0,05 (*); p<0,01 (**) – diferença significativa em relação à QUER (quercetina) (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Abreviaturas: ANOVA: análise de variância; DP: desvio padrão; FcγR: receptor para porção Fc de IgG; IC IgG-OVA: imunocomplexos de OVA e IgG anti-OVA; IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina; QLluc^{PMN}: quimioluminescência dependente de lucigenina; QLlum^{PMN}: quimioluminescência dependente de luminol; QUER: quercetina.

4.1.2.3. Análise qualitativa da relação estrutura-atividade

Na série de 3-fenilcumarinas estudadas, verificou-se que aquelas sem grupos substituintes hidroxí ou acetoxi (**C15** e **C1**) não tiveram atividade inibitória significativa sobre a $QLlum^{PMN}$ e a $QLluc^{PMN}$ produzida pelos neutrófilos estimulados via receptores da classe $Fc\gamma R$, na maior concentração estudada, correspondente a 50 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 4.3). Portanto, a presença dos grupos substituintes hidroxí ou acetoxi parece ser essencial para a atividade biológica avaliada. Entretanto, o número e a posição desses grupos substituintes no esqueleto 3-fenilcumarínico influenciaram de modo diferente o efeito inibitório dessas substâncias sobre a $QLluc^{PMN}$ e a $QLlum^{PMN}$, conforme descrito nos itens a seguir.

4.1.2.3.1. Características estruturais das 3-fenilcumarinas relacionadas à inibição da $QLluc^{PMN}$

A partir da comparação dos valores de CI_{50} das 3-fenilcumarinas entre si e com a **QUER** (Tabela 4.3), observou-se que:

(a) tiveram valores de CI_{50} significativamente maiores que a **QUER**, ou seja, foram menos ativas que esse flavonóide: as 3-fenilcumarinas com apenas um grupo substituinte hidroxí ou acetoxi na molécula, na posição C-6 (**C18**, **C18a**) ou C-7 do esqueleto cumarínico (**C11**, **C11a**).

(b) tiveram valores de CI_{50} significativamente menores que a **QUER**, ou seja, foram mais ativas que esse flavonóide: a 3-fenilcumarina contendo os grupos substituintes 6,7-diidroxi e 3',4'-metilenodioxi (**C13**), e as substâncias com o grupo substituinte *orto*-diacetoxi no esqueleto cumarínico e/ou no anel 3-fenílico (**C13a**, **C23a** e **C24a**).

(c) tiveram valores de CI_{50} estatisticamente semelhantes à **QUER**: as 3-fenilcumarinas com um grupo substituinte hidroxi em C-6 somado ao grupo substituinte 3',4'-metilenodioxi (**C6**) ou hidroxi nas posições C-2', C-3' ou C-4' (**C25**, **C19**, **C20**, respectivamente), bem como as respectivas análogas acetoxiladas dessas substâncias (**C6a**, **C25a**, **C19a**, **C20a**); as 3-fenilcumarinas contendo grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxi no anel 3-fenílico (**C23**, **C24**).

(d) a acetilação dos grupos substituintes hidroxi não influenciou de modo significativo a atividade das 3-fenilcumarinas monoidroxiladas (**C6**, **C11** e **C18**) ou dihidroxiladas (**C13**, **C19**, **C20**, **C25**), mas propiciou um aumento significativo da atividade da substância triidroxilada (**C23**) e da tetraidroxilada (**C24**).

(e) entre as 3-fenilcumarinas hidroxiladas contendo o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxi (**C6**, **C11** e **C13**), a mudança da posição do grupo substituinte hidroxi de C-6 (**C6**) para C-7 (**C11**) levou a um aumento pequeno da atividade de inibição da $QLuc^{PMN}$ ($p < 0,05$). Por outro lado, a presença desse grupo substituinte em ambas as posições, ou seja, a 6,7-diidroxilação (**C13**), levou a

um aumento de cerca de oito vezes dessa atividade biológica ($p < 0,001$), quando comparada à monoidroxilação.

(f) entre as 3-fenilcumarinas acetoxiladas contendo o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C6a**, **C11a** e **C13a**), verificou-se que a mudança da posição do grupo substituinte acetoxi de C-6 (**C6a**) para C-7 (**C11a**) não influenciou de modo significativo a atividade de inibição da QLluc^{PMN}. Entretanto, a presença do grupo substituinte acetoxi em ambas as posições (**C13a**), isto é, a 6,7-di-acetoxilação, levou a um aumento significativo desta atividade biológica ($p < 0,001$) quando comparada à monoacetoxilação.

(g) para as 3-fenilcumarinas com o grupo substituinte hidroxí em C-6, mas sem o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C18**, **C19**, **C20**, **C25**, **C23**, **C24**), a presença de um ou mais grupos substituintes hidroxí no anel 3-fenílico levou a uma maior atividade inibitória sobre a QLluc^{PMN}, quando comparada à substância **C18**, que não possui este grupo substituinte no anel 3-fenílico. Entretanto, o número e a posição dos grupos substituintes hidroxí não foi relevante para a atividade biológica de inibição da QLluc^{PMN}.

(h) para as 3-fenilcumarinas com o grupo substituinte acetoxi em C-6, mas sem o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C18a**, **C19a**, **C20a**, **C25a**, **C23a**, **C24a**), observou-se que o efeito inibitório sobre a QLluc^{PMN} da substância **C18a**, que não possui grupo substituinte acetoxi no anel 3-fenílico, foi semelhante ao das substâncias com esse grupo substituinte em C-3' (**C19a**) ou

C-4' (**C20a**). Por outro lado, as 3-fenilcumarinas com grupo substituinte acetoxi em C-2' (**C25a**), bem como as substâncias 3',4'-*orto*-diacetoxiladas (**C23a**, **C24a**), foram significativamente mais efetivas ($p < 0,001$) em inibir a QLLuc^{PMN}, quando comparadas às demais substâncias descritas neste subitem (**C18a**, **C19a**, **C20a**).

(i) a mudança do grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxí para 3',4'-metilenodioxí não influenciou na intensidade da atividade biológica da 3-fenilcumarina com grupo hidroxí em C-6 (**C23** vs. **C6**), mas aumentou a atividade inibitória da substância 6,7-diidroxilada (**C24** vs. **C13**, $p < 0,05$) sobre a QLLuc^{PMN}.

(j) a mudança do grupo substituinte 3',4'-diacetoxí para 3',4'-metilenodioxí levou a uma redução significativa na atividade biológica da 3-fenilcumarina com um grupo acetoxí em C-6 (**C23a** vs. **C6a**, $p < 0,01$) mas não influenciou na intensidade do efeito inibitório da substância 6,7-di-acetoxilada (**C24a** vs. **C13a**) sobre a QLLuc^{PMN}.

4.1.2.3.2. Características estruturais das 3-fenilcumarinas relacionadas à inibição da QLLum^{PMN}

A comparação dos valores de CI_{50} das 3-fenilcumarinas entre si e com a QUER (Tabela 4.3) permitiu observar que:

(a) tiveram valores de CI_{50} significativamente menores que a QUER, ou seja, foram mais ativas que esse flavonóide: a 3-fenilcumarina contendo os grupos substituintes 6,7-*orto*-diidroxí e 3',4'-metilendioxi (C13), e as substâncias com o grupo substituinte 6,7-*orto*-diacetoxi no esqueleto cumarínico (C13a e C24a).

(b) tiveram valores de CI_{50} estatisticamente semelhantes ao da QUER, ou seja, foram tão ativas quanto esse flavonóide: as 3-fenilcumarinas contendo um grupo substituinte hidroxí em C-6, somado ao grupo substituinte hidroxí em C-2' (C25) ou 3',4'-*orto*-diidroxí (C23), bem como os análogos acetoxilados dessas substâncias (C25a, C23a).

(c) tiveram valores de CI_{50} significativamente maiores que a QUER, ou seja, foram menos ativas que esse flavonóide: a 3-fenilcumarina 6,7,3',4'-tetraidroxilada (C24), a substância 6,4'-diidroxilada (C20) e sua análoga acetoxilada (C20a), bem como as substâncias 6-acetoxiladas sem grupos substituintes no anel 3-fenílico (C18a) ou com grupo substituinte acetoxi em C-3' (C19a).

(d) as 3-fenilcumarinas com o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí e apenas um grupo substituinte hidroxí, livre ou esterificado, no C-6 (**C6, C6a**) ou C-7 (**C11, C11a**) do esqueleto cumarínico não inibiram a QLlum^{PMN}, na maior concentração avaliada (50 µmol/L). Por outro lado, a presença dos grupos substituintes hidroxí ou acetoxí em ambas as posições, isto é, a 6,7-di-hidroxilação (**C13**) ou a 6,7-di-acetoxilação (**C13a**), propiciou uma atividade inibitória acentuada sobre a QLlum^{PMN}, semelhante à da **QUER**.

(e) entre as 3-fenilcumarinas com grupo substituinte hidroxí em C-6, mas sem o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C18, C19, C20, C25, C23, C24**), somente aquelas contendo grupo substituinte hidroxí adicional em C-2' (**C25**) ou C-4' (**C20**), ou o grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxí (**C23, C24**) inibiram a QLlum^{PMN}. As substâncias sem grupo substituinte hidroxí no anel 3-fenílico (**C18**) ou contendo o mesmo em C-3' (**C19**) não inibiram a QLlum^{PMN}, na maior concentração avaliada (50 µmol/L).

(f) entre as 3-fenilcumarinas com o grupo substituinte acetoxí em C-6, mas sem o grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C18a, C19a, C20a, C25a, C23a, C24a**), as substâncias sem grupo substituinte no anel 3-fenílico (**C18a**) ou contendo um grupo substituinte acetoxí em C-4' (**C20a**) tiveram atividades inibitórias semelhantes sobre a QLlum^{PMN}. Entretanto, a presença do grupo substituinte acetoxí adicional em C-2' (**C25a**) ou C-3' (**C19a**), bem como a presença do grupo substituinte 3',4'-*orto*-diacetoxí (**C23a, C24a**), levaram a um

aumento significativo na atividade ($p < 0,001$) inibitória sobre a QLlum^{PMN}, em relação à demais posições.

(g) a esterificação dos grupos substituintes hidroxí não influenciou de modo significativo a atividade inibitória das 3-fenilcumarinas 6,7-, 6,4'- ou 6,2'- di-hidroxiladas (**C13**, **C20** e **C25**, respectivamente) ou da substância 6,3',4'-trihidroxilada (**C23**), mas levou a um pequeno aumento da atividade inibitória da substância 6,7,3',4'-tetraidroxilada (**C24**).

(h) a mudança do grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxí para 3',4'-metilenodioxí reduziu a atividade inibitória da 3-fenilcumarina contendo o grupo substituinte hidroxí apenas em C-6 (**C23** vs. **C6**), e aumentou a atividade inibitória da substância com o grupo substituinte 6,7-*orto*-diidroxí (**C24** vs. **C13**), sobre a QLlum^{PMN}.

(i) a mudança do grupo substituinte 3',4'-*orto*-diacetoxí para 3',4'-metilenodioxí provocou uma redução significativa na intensidade do efeito inibitório da 3-fenilcumarina com grupo substituinte acetoxí apenas em C-6 (**C23a** vs. **C6a**), mas não influenciou na intensidade do efeito inibitório da substância 6,7-di-acetoxilada (**C24a** vs. **C13a**), sobre a QLlum^{PMN}.

4.1.3. Efeito das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ R, em função do tempo de pré-tratamento

As 3-fenilcumarinas selecionadas para esta avaliação (**C13**, **C13a**, **C24a**) foram aquelas que apresentaram maior efeito inibitório sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores Fc γ R (Tabela 4.3).

As células foram incubadas a 37°C por diferentes períodos (3, 15 e 30 minutos) na presença da **QUER** ou das 3-fenilcumarinas (**C13**, **C13a**, **C23a**, **C24a**). Após esses períodos de pré-tratamento, as células foram estimuladas via receptores Fc γ R, com o uso de IC IgG-OVA, durante 30 minutos a 37°C. Observou-se que a intensidade do efeito inibitório das substâncias **C13**, **C13a** e **QUER** sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, avaliado por QLLum^{PMN} ou por QLLuc^{PMN}, não variou de modo significativo com o tempo de incubação (Figura 4.4). Para a 3-fenilcumarina **C24a** verificou-se uma tendência de redução na intensidade do efeito inibitório no tempo de 30 minutos para a medida de QLLuc^{PMN}, e nos tempos de 15 e 30 minutos para a QLLum^{PMN}.

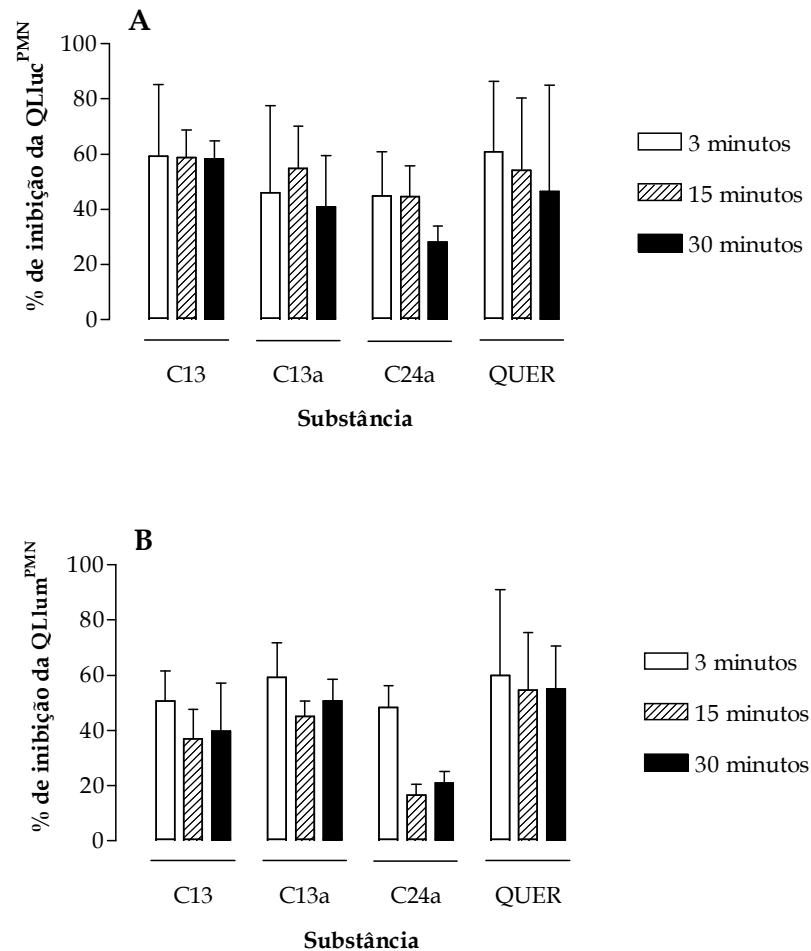


Figura 4.4. Efeito inibitório da **QUER** e das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a** sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores **FcγR**, após diferentes tempos de pré-tratamento, expresso como porcentagem de inibição da $QLluc^{PMN}$ (**gráfico A**) ou da $QLlum^{PMN}$ (**gráfico B**). Valores referentes à média \pm DP de um experimento, com medida em duplicata. As substâncias foram avaliadas nas seguintes concentrações: **C13** e **C13a**: 1 $\mu\text{mol/L}$; **C24a**: 0,5 $\mu\text{mol/L}$; **QUER**: 5 $\mu\text{mol/L}$ para $QLluc^{PMN}$ e 2,5 $\mu\text{mol/L}$ para $QLlum^{PMN}$. **Abreviaturas:** **DP:** desvio padrão; **FcγR:** receptor para porção Fc de IgG; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **QLluc^{PMN}:** quimioluminescência dependente de lucigenina; **QLlum^{PMN}:** quimioluminescência dependente de luminol; **QUER:** quercetina.

4.1.4. Efeito das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR e/ou CR

Dentro do grupo de 3-fenilcumarinas que inibiram o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados via receptores FcγR (Tabela 4.3), as três substâncias com maior efeito inibitório (**C13**, **C13a**, **C24a**) tiveram seus efeitos avaliados também sobre esta função celular ativada via receptores CR ou FcγR+CR. A ativação específica do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, via receptores das classes FcγR e/ou CR, foi obtida com o uso de diferentes tipos de ICs.

Para as 3-fenilcumarinas **C13** (Figura 4.5.A) e **C24a** (Figura 4.5.C), verificou-se uma tendência de aumento na intensidade do efeito inibitório sobre a QLuc^{PMN} gerada por neutrófilos estimulados via receptores CR, na menor concentração avaliada, quando comparada ao receptor FcγR. Por outro lado, observou-se uma tendência de aumento da atividade inibitória da 3-fenilcumarina **C13a** (Figura 4.5.B), na menor concentração avaliada, e da substância **C24a** (Figura 4.5.C), nas duas maiores concentrações avaliadas, sobre a função celular ativada por meio de CR ou FcγR+CR. Para a **QUER**, o efeito inibitório sobre a QLuc^{PMN}, dentro de cada concentração avaliada, não foi dependente da classe de receptor de membrana ativado.

Observou-se que a intensidade do efeito inibitório das substâncias **C13**, **C13a** e **C24a** sobre a QLuc^{PMN} não foi dependente da classe de receptor de membrana ativado nas duas maiores concentrações avaliadas, mas apresentou uma tendência de redução quando apenas o receptor da classe FcγR foi ativado (Figuras 4.6.A, B e C). Para a **QUER**, os valores de porcentagem de inibição da

QLlum^{PMN} foram semelhantes, dentro de cada concentração avaliada, independente da classe de receptor de membrana ativado (Figura 4.6.D).

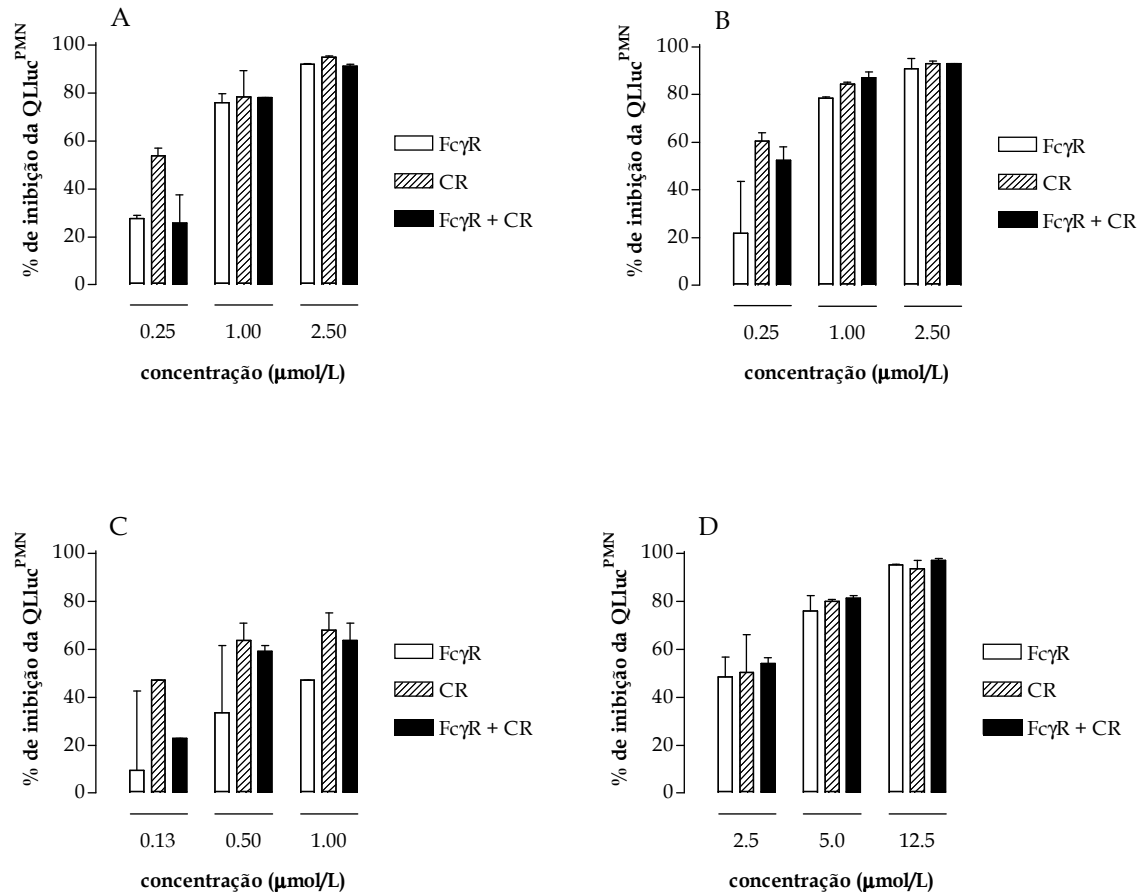


Figura 4.5. Efeito inibitório das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a** e da **QUER**, em diferentes concentrações (**gráficos A - D**), sobre a QLluc^{PMN} gerada por neutrófilos estimulados via diferentes classes de receptores de membrana. Valores expressos como média \pm DP da porcentagem de inibição da QLluc^{PMN}, referente a um experimento com medida em duplicata. **Abreviaturas:** **CR:** receptor de complemento; **DP:** desvio padrão; **FcγR:** receptor para porção Fc de IgG; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **QLluc^{PMN}:** quimioluminescência dependente de lucigenina; **QUER:** quercetina.

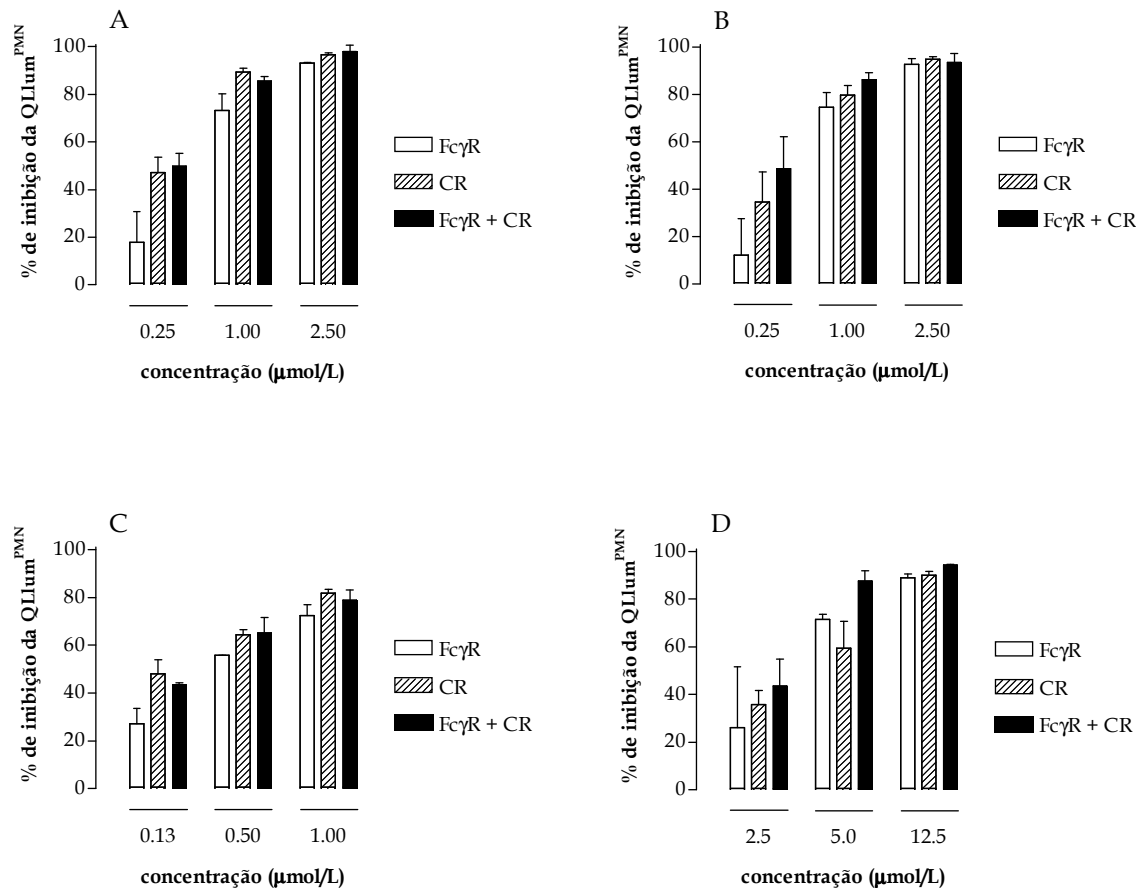


Figura 4.6. Efeito inibitório das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a** e da **QUER**, em diferentes concentrações (**gráficos A - D**), sobre a $QLlum^{PMN}$ gerada por neutrófilos estimulados via diferentes classes de receptores de membrana. Valores expressos como média \pm DP da porcentagem de inibição da $QLlum^{PMN}$, referente a um experimento com medida em duplicata. **Abreviaturas:** **CR:** receptor de complemento; **DP:** desvio padrão; **FcγR:** receptor para porção Fc de IgG; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **QLlum^{PMN}:** quimioluminescência dependente de luminol; **QUER:** quercetina.

4.1.5. Efeito das 3-fenilcumarinas C13, C13a e C24a sobre a fagocitose de ICs por neutrófilos, mediada por receptores Fc γ R

A interação entre IC IgG-OVA e receptores de membrana da classe Fc γ R presentes em neutrófilos desencadeia o processo de fagocitose, levando à internalização desses ICs pela célula. A presença de IC IgG-OVA, tanto ligado à superfície quanto no interior da célula, foi detectada empregando-se anticorpo anti-IgG conjugado com ouro coloidal, o qual pode ser identificado como pontos eletrôn-densos. A Figura 4.7 ilustra a fagocitose de IC IgG-OVA por neutrófilos de coelho, na presença de DMSO, avaliada por microscopia eletrônica de transmissão.

Foram fotografados neutrófilos tratados com DMSO (controle), **QUER** (50 μ mol/L) ou com as 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** ou **C24a** (25 μ mol/L). Essas três 3-fenilcumarinas foram selecionadas por terem sido mais efetivas que a **QUER** em inibir o metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados via receptores da classe Fc γ R (Tabela 4.3).

Dentro das condições avaliadas, não foi observada alteração significativa na morfologia dos neutrófilos e na capacidade fagocítica dessas células na presença da **QUER** ou das 3-fenilcumarinas (dados não apresentados), quando comparada ao controle (DMSO).

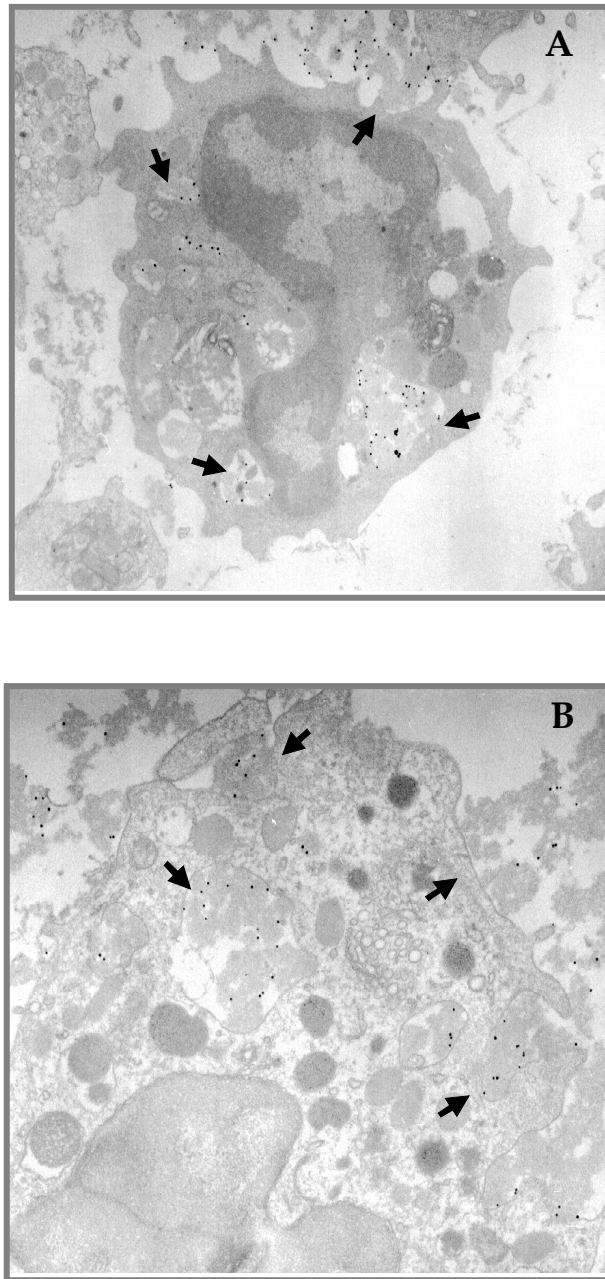


Figura 4.7. Foto representativa da fagocitose de ICs por neutrófilos de coelho, mediada por receptores $Fc\gamma R$, avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. As células foram tratadas com DMSO, e estimuladas com IC IgG-OVA. A presença de ICs fagocitados ou ligados na superfície das células (indicado pelas setas) foi detectada com anticorpos anti-IgG marcados com ouro coloidal, que podem ser visualizados como pontos escuros. **A:** aumento de 3800 vezes. **B:** aumento de 4800 vezes. **Abreviaturas:** **DMSO:** dimetilsulfóxido; **IC IgG-OVA:** imunocomplexos formados de OVA e IgG anti-OVA; **IgG:** imunoglobulina da classe G; **OVA:** ovalbumina.

4.2. Ensaio em sistemas não-celulares

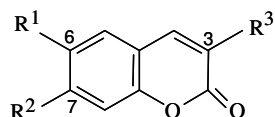
4.2.1. Avaliação da atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas frente ao radical livre DPPH

4.2.1.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$

Foi feita a avaliação da atividade da **QUER** e das vinte 3-fenilcumarinas na concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$, com o intuito de selecionar as substâncias com atividade antioxidante. Neste estudo, foram consideradas antioxidantes as substâncias capazes de reagir com o radical livre DPPH, promovendo a sua redução.

As 3-fenilcumarinas **C13**, **C23**, **C24** e **C25** e o flavonóide **QUER** tiveram atividade antioxidante significativa, nas condições experimentais empregadas. Para estas substâncias, foi feita também a avaliação da atividade antioxidante na concentração de 5 $\mu\text{mol/L}$, para selecionar a faixa de concentração a ser utilizada para a construção das curvas de porcentagem de redução do DPPH em função da concentração da substância-teste. Os resultados são apresentados na Tabela 4.4.

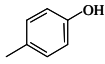
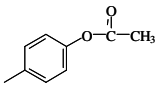

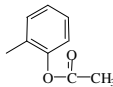
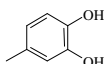
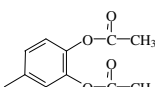
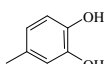
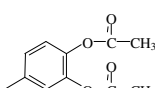
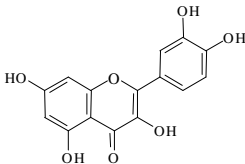
Tabela 4.4. Porcentagem de redução do DPPH na presença das 3-fenilcumarinas, nas concentrações de 50 e 5 $\mu\text{mol/L}$.



código	Substância			DPPH reduzido (%) ^(a)	
	R ¹	R ²	R ³	50 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$
C1	H	H		0,8 \pm 0,8	n.d.
C6	OH	H		2,7 \pm 0,4	n.d.
C6a	OCOCH ₃	H		2,9 \pm 1,6	n.d.
C11	H	OH		1,6 \pm 1,8	n.d.
C11a	H	OCOCH ₃		1,8 \pm 2,0	n.d.
C13	OH	OH		78,6 \pm 1,4	23,4 \pm 0,5
C13a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		3,7 \pm 1,6	n.d.
C15	H	H		1,1 \pm 2,5	n.d.
C18	OH	H		2,4 \pm 2,2	n.d.
C18a	OCOCH ₃	H		2,2 \pm 2,3	n.d.
C19	OH	H		3,4 \pm 1,4	n.d.
C19a	OCOCH ₃	H		0,8 \pm 1,3	n.d.

(continua)

(continuação)

código	Substância			DPPH reduzido (%) ^(a)	
	R ¹	R ²	R ³	50 µmol/L	5 µmol/L
C20	OH	H		2,6 ± 0,2	n.d.
C20a	OCOCH ₃	H		1,2 ± 1,8	n.d.
C25	OH	H		59,5 ± 3,2	4,9 ± 0,1
C25a	OCOCH ₃	H		2,6 ± 2,1	n.d.
C23	OH	H		79,6 ± 1,4	13,5 ± 2,1
C23a	OCOCH ₃	H		0,8 ± 0,3	n.d.
C24	OH	OH		78,5 ± 1,0	30,5 ± 2,8
C24a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		5,0 ± 0,9	n.d.
QUER				87,2 ± 3,0	33,7 ± 0,4

(a) Valores expressos como média ± DP da porcentagem de redução do DPPH, para dois experimentos, cada um com medidas realizadas em duplicata. **n.d.**: não determinado, pois a substância não apresentou atividade significativa na concentração de 50 µmol/L.

Abreviaturas: DP: desvio padrão; DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; QUER: quercetina.

4.2.1.2. Avaliação da porcentagem de redução do DPPH em função da concentração das 3-fenilcumarinas

Para dar prosseguimento ao estudo, a atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas **C13**, **C23**, **C24** e **C25** e do flavonóide **QUER**, selecionados pela triagem descrita no item anterior, foi avaliada em seis concentrações diferentes.

Os valores de porcentagem de redução do DPPH em função da concentração estão representados na Figura 4.8. Esses dados foram empregados para o cálculo do CR_{50} , que é a concentração que promoveu 50% de redução do DPPH. Esse parâmetro foi utilizado para a comparação da atividade das 3-fenilcumarinas entre si e com a **QUER** (Tabela 4.5).

Observou-se que a 3-fenilcumarina **C24** teve atividade antioxidante semelhante à da **QUER**, enquanto que os demais (**C13**, **C23** e **C25**) foram significativamente menos ativos que o flavonóide ($p < 0,001$).

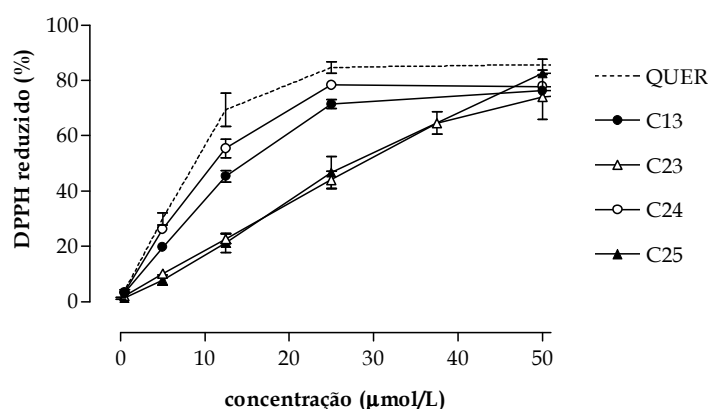
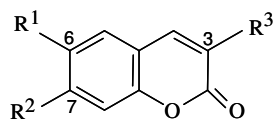


Figura 4.8. Porcentagem de redução do DPPH promovido por diferentes concentrações de **QUER** (linha pontilhada) e das 3-fenilcumarinas **C13**, **C23**, **C24** e **C25**. Valores expressos como média \pm DP de três experimentos, com medidas em duplicata. **Abreviaturas:** DP: desvio padrão; DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; **QUER:** quercetina.

Tabela 4.5. Concentração das 3-fenilcumarinas que promoveu 50% de redução (CR_{50}) do radical livre DPPH.



Substância				CR_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ^(a)
código	R ¹	R ²	R ³	
C13	OH	OH		13,16 \pm 0,56 *
C25	OH	H		24,86 \pm 2,50 **
C23	OH	H		26,77 \pm 1,87 **
C24	OH	OH		9,81 \pm 0,60
QUER				7,68 \pm 0,89

(a) Valores expressos como média \pm DP de três experimentos, com medidas realizadas em duplicata. *Análise estatística*: $p < 0,01$ (*); $p < 0,001$ (**) – diferença significativa em relação à QUER (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Abreviaturas: ANOVA: análise de variância; DP: desvio padrão; DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; QUER: quercetina.

4.2.1.3. Análise qualitativa da relação estrutura-atividade

Na série de 3-fenilcumarinas estudada, verificou-se que as substâncias contendo o grupo substituinte *orto*-diidroxí (**C13**, **C23**, **C24**) ou grupo substituinte hidroxí em C-6 e C-2' (**C25**), apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. Os demais compostos não foram ativos, dentro das condições avaliadas.

O número e a posição dos grupos substituintes hidroxí influenciou a atividade antioxidante neste sistema, de modo que as substâncias com maior número de grupos substituintes hidroxí (**QUER** e a 3-fenilcumarina tetraidroxilada **C24**) foram as mais ativas e tiveram atividades semelhantes entre si. A mudança do grupo substituinte 3',4'-diidroxí pelo grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí (**C24** vs. **C13**) reduziu significativamente a atividade antioxidante.

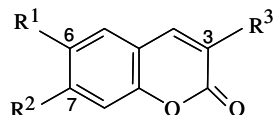
A remoção do grupo substituinte hidroxí em C-7 (**C23** vs. **C24**) também levou a uma diminuição da capacidade antioxidante. Além disso, a acetilação dos grupos substituintes hidroxí das 3-fenilcumarinas **C13**, **C23**, **C24** e **C25** diminuiu significativamente a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

4.2.2. Avaliação da atividade antioxidante das 3-fenilcumarinas, empregando a reação HRP-H₂O₂-luminol

4.2.2.1. Avaliação preliminar de atividade na concentração de 50 µmol/L

Foi feita uma avaliação inicial do efeito das 3-fenilcumarinas sobre a QL^{HRP} (quimioluminescência produzida pela reação HRP-H₂O₂-luminol), na concentração final de 50 µmol/L. Foram consideradas ativas as substâncias **C13**, **C23**, **C24**, **C24a**, **C25** e a **QUER**, que promoveram inibição da atividade biológica maior que 50%. As 3-fenilcumarinas **C11a**, **C18a**, **C20** e **C20a** promoveram um pequeno aumento da QL^{HRP}, enquanto as demais substâncias (**C1**, **C6**, **C6a**, **C11**, **C13a**, **C15**, **C18**, **C18a**, **C19**, **C23a** e **C25a**) promoveram inibição da QL^{HRP} menor que 50%. (Tabela 4.6).

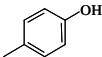
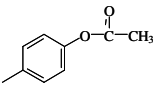

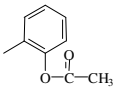
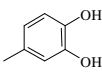
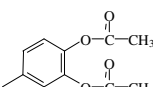
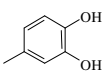
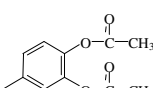
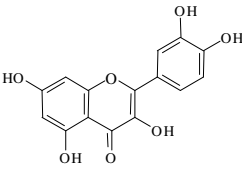
Tabela 4.6. Porcentagem de inibição ou aumento da quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol (QL^{HRP}), na presença de 50 μmol/L das 3-fenilcumarinas.



código	Substância			Inibição da QL ^{HRP} (%) ^(a)	Aumento da QL ^{HRP} (%) ^(a)
	R ¹	R ²	R ³		
C1	H	H		21,9 ± 11,7	-
C6	OH	H		35,8 ± 7,4	-
C6a	OCOCH ₃	H		-	5,1 ± 10,2
C11	H	OH		27,8 ± 7,9	-
C11a	H	OCOCH ₃		-	32,4 ± 2,1
C13	OH	OH		99,9 ± 0,1	-
C13a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		8,1 ± 5,4	-
C15	H	H		11,9 ± 7,2	-
C18	OH	H		45,9 ± 1,1	-
C18a	OCOCH ₃	H		-	4,0 ± 7,0
C19	OH	H		28,0 ± 8,4	-
C19a	OCOCH ₃	H		-	13,6 ± 4,7

(continua)

(continuação)

código	Substância			Inibição da QL ^{HRP} (%) ^(a)	Aumento da QL ^{HRP} (%) ^(a)
	R ¹	R ²	R ³		
C20	OH	H		28,2 ± 3,7	-
C20a	OCOCH ₃	H		-	20,9 ± 6,8
C25	OH	H		83,5 ± 7,2	-
C25a	OCOCH ₃	H		24,2 ± 8,7	-
C23	OH	H		99,9 ± 0,1	-
C23a	OCOCH ₃	H		28,9 ± 1,4	-
C24	OH	OH		99,9 ± 0,1	-
C24a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		64,9 ± 3,4	-
QUER				99,9 ± 0,1	-

(a) Valores expressos como média ± DP da porcentagem de inibição ou de aumento da QL^{HRP} em relação ao controle (DMSO), para dois experimentos com medidas em duplicata.

Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; DP: desvio padrão; HRP: *horseradish peroxidase*; QL^{HRP}: quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol; QUER: quercetina.

4.2.2.2. Atividade biológica das 3-fenilcumarinas em função da concentração

Para dar prosseguimento ao estudo, foi avaliado o efeito das 3-fenilcumarinas consideradas ativas, de acordo com a triagem de atividade biológica descrita no item 4.2.2.1., em função da sua concentração.

As substâncias **C13**, **C23**, **C24**, **C24a**, **C25** e a **QUER** inibiram a QL^{HRP} de modo dependente da concentração (Figura 4.9), permitindo o cálculo dos valores de CI_{50} (Tabela 4.7). Baseado nesses valores de CI_{50} , observou-se que as substâncias **C13**, **C23** e **C24** foram tão ativas quanto a **QUER**, enquanto que as substâncias **C24a** e **C25** tiveram atividade significativamente menor ($p < 0,01$) que o flavonóide.

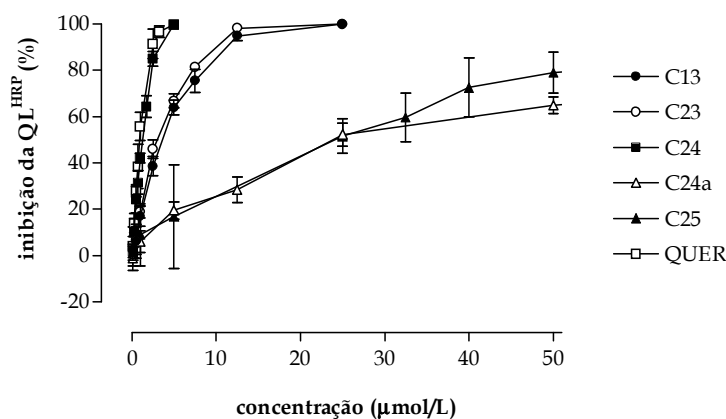


Figura 4.9. Inibição da QL^{HRP} em função da concentração da **QUER** e das 3-fenilcumarinas. Valores expressos como média \pm DP de três experimentos independentes, com medidas em duplicata. **Abreviaturas:** DP: desvio padrão; **HRP:** *horseradish peroxidase*; QL^{HRP} : quimioluminescência produzida pela reação $HRP-H_2O_2$ -luminol; **QUER:** quercetina.

Tabela 4.7. Concentração das 3-fenilcumarinas que promoveu 50% de inibição (CI_{50}) da QL^{HRP} (quimioluminescência produzida pela reação $HRP-H_2O_2$ -luminol).

código	Substância			CI_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ^(a)
	R^1	R^2	R^3	
C13	OH	OH		$3,38 \pm 0,32$
C25	OH	H		$24,61 \pm 6,90$ *
C23	OH	H		$2,87 \pm 0,15$
C24	OH	OH		$1,18 \pm 0,09$
C24a	OCOCH ₃	OCOCH ₃		$28,23 \pm 7,92$ *
QUER				$0,91 \pm 0,13$

(a) Valores expressos como média \pm DP de três experimentos, com medidas realizadas em duplicata. *Análise estatística*: $p < 0,01$ (*) - diferença significativa em relação à **QUER** (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Abreviaturas: ANOVA: análise de variância; CI_{50} : concentração que promove 50% de inibição da resposta biológica; DP: desvio padrão; HRP: *horseradish peroxidase*; QL^{HRP} : quimioluminescência produzida pela reação $HRP-H_2O_2$ -luminol; **QUER**: quercetina.

4.2.2.3. Análise qualitativa da relação estrutura-atividade

A partir do conjunto de resultados obtidos, observou-se que as 3-fenilcumarinas sem grupos substituintes hidroxí ou acetoxi (**C1** e **C15**) e a maioria das substâncias acetoxiladas (**C6a**, **C13a**, **C18a**, **C19a**, **C23a**, **C25a**) não tiveram efeito inibitório sobre a QL^{HRP}, nas condições avaliadas. A presença do grupo substituinte acetoxi em C-7 (**C11a**) ou em C-6 e C-4' (**C20a**) levou a um pequeno aumento da QL^{HRP}. Por outro lado, a 6,7,3',4'-tetraacetoxilação (**C24a**) levou à inibição da QL^{HRP}.

Dentre as 3-fenilcumarinas hidroxiladas, a presença do grupo substituinte *orto*-diidroxí no esqueleto cumarínico e/ou no anel 3-fenílico (**C13**, **C23**, **C24**) foi a característica estrutural mais relevante para a inibição da atividade biológica em questão, tornando essas substâncias tão efetivas quanto a **QUER**. A presença de apenas um grupo substituinte hidroxí (**C6**, **C11**, **C18**) na molécula, ou de um grupo substituinte hidroxí em C-6, somado a outro em C-3' ou C-4' (**C19**, **C20**), levou à redução da atividade inibitória sobre a QL^{HRP}.

Para as 3-fenilcumarinas **C20**, **C19** e **C25**, que diferem apenas na posição do grupo substituinte hidroxí no anel 3-fenílico, a presença desse grupo substituinte em C-2' conferiu atividade inibitória maior do que nas posições C-3' e C-4'.

4.3. Avaliação da interação entre as 3-fenilcumarinas e a HRP por *docking*

Com o intuito de propor um modo de ligação das 3-fenilcumarinas com a HRP, foi utilizado o procedimento de *docking* flexível, empregando a estrutura da HRP resolvida a 1.57 Å (código no PDB: 1H5G) como receptor (BERGLUND et al., 2002). Não foi utilizada a estrutura da HRP em complexo com o ácido benzoidroxâmico, resolvida a 2.0 Å (código no PDB: 2ATJ), devido à grande similaridade entre as estruturas ligada e não ligada (HENRIKSEN et al., 1998).

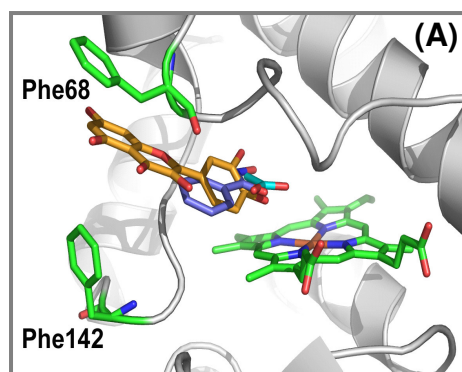
Na Figura 4.10.A, a melhor solução encontrada pelo GOLD para a **QUER** com a estrutura não ligada da HRP (código no PDB: 1H5G) está sobreposta à estrutura cristalina da HRP em complexo com o ácido benzoidroxâmico (código no PDB: 2ATJ) e também à estrutura cristalina da HRP em complexo com o íon acetato (código no PDB: 1H5A).

Os resultados sugerem que as 3-fenilcumarinas avaliadas se ligariam à HRP de modo que os grupos substituintes hidroxí ou acetoxí específicos ocupariam as posições originalmente ocupadas pelos átomos de oxigênio dos ligantes nos complexos cristalográficos, próximos ao grupo heme. Além disso, o anel B da **QUER** ocupou o sítio de ligação do anel aromático do ácido benzoidroxâmico, após a simulação. Particularmente para este flavonóide, os grupos substituintes hidroxí em *meta* e *para* do anel B indicam as melhores posições que estes grupos substituintes devem ocupar no anel aromático, uma vez que a **QUER** foi uma das substâncias com maior atividade biológica.

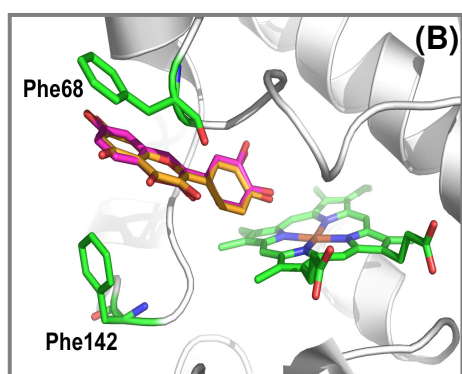
De modo semelhante, após a simulação de *docking* pelo GOLD, as 3-fenilcumarinas **C13**, **C23** e **C24** foram orientadas com seus grupos substituintes *orto*-diidroxí próximos ao grupo heme, no mesmo sítio de ligação observado

para o grupo substituinte *orto*-diidroxí da **QUER**. Esses resultados reforçam a importância dos grupos substituintes hidroxí nas posições *meta* e *para* do anel benzênico, tanto do esqueleto cumarínico quanto do anel 3-fenílico. A figura 4.10.B mostra a orientação da 3-fenilcumarina **C23**, sobreposta à **QUER**.

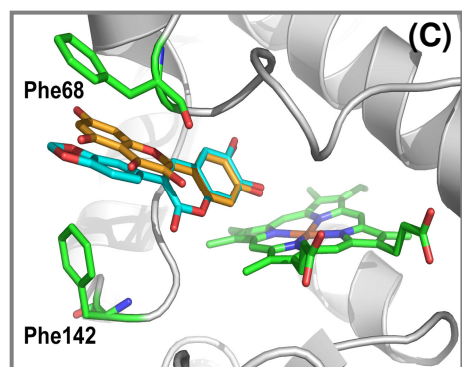
Por outro lado, os resultados obtidos também sugerem que, teoricamente, os átomos de oxigênio do grupo substituinte 3',4'-metilenodioxí presente em algumas 3-fenilcumarinas não mimetizam o grupo substituinte *orto*-diidroxí do anel B do flavonóide estudado. Após a simulação, a melhor solução para a 3-fenilcumarina **C13**, uma das substâncias com maior efeito inibitório sobre a atividade da HRP, indica uma orientação invertida para esta molécula dentro do sítio ativo da enzima, com o grupo substituinte *orto*-diidroxí posicionado próximo ao grupo heme (Figura 4.10.C).



(A): A melhor solução de GOLD para a QUER (átomos de carbono em laranja) com a estrutura da HRP não ligada (código no PDB: 1H5G) está sobreposta à estrutura cristalina da HRP complexada com ácido benzoidroxâmico (código no PDB: 2ATJ; ligante com átomos de carbono em violeta), e à estrutura cristalina da HRP complexada com íon acetato (código no PDB: 1H5A; ligante com átomos de carbono em ciano).



(B): Sobreposição das melhores soluções para a QUER (átomos de carbono em laranja) e a 3-fenilcumarina C23 (átomos de carbono em magenta) com a estrutura da HRP não ligada (código no PDB: 1H5G).



(C): Sobreposição das melhores soluções para a QUER (átomos de carbono em laranja) e a 3-fenilcumarina C13 (átomos de carbono em ciano) com a estrutura da HRP não ligada (código no PDB: 1H5G).

Figura 4.10. Interação da QUER (quercetina) e das 3-fenilcumarinas C13 e C23 com o sítio ativo da enzima HRP (*horseradish peroxidase*). Para todas as estruturas (A, B, C), o grupo heme e resíduos selecionados da HRP estão representados com os átomos de carbono em verde, e os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

5. Discussão

5.1. Efeito modulatório das 3-fenilcumarinas nos modelos experimentais celulares

A formação de ICs na circulação é um mecanismo essencial para o processo de defesa imunológica do organismo, pois possibilita a neutralização e a eliminação de antígenos solúveis (SCHIFFERLY; TAYLOR, 1989). Quando ocorre o aumento da formação de ICs e/ou a deficiência nos mecanismos de eliminação desses ICs, observa-se a deposição dos mesmos em tecidos, principalmente do sistema renal, articular e vascular. Essas situações patológicas, denominadas “doenças por ICs”, são caracterizadas também por um processo inflamatório crônico com grande infiltração neutrofílica nos locais de deposição dos ICs (JANCAR; CRESPO, 2005).

A intensa ativação neutrofílica leva à liberação de grandes quantidades de EROs e de enzimas lisossomais, que superam a capacidade de defesa tecidual local, mediada por substâncias e enzimas antioxidantes (ácido ascórbico, β -caroteno, glutathione peroxidase, SOD, catalase) e anti-proteinases (α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, inibidor de protease secretória de leucócitos). Conseqüentemente, ocorrem diversas lesões teciduais nessas doenças mediadas por ICs (SCHIFFERLI; TAYLOR, 1989; BABIOR, 2000a; DAVIES, 2000).

O envolvimento das EROs produzidas por neutrófilos na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias têm atraído o interesse na descoberta de novos compostos com propriedades antioxidantes, capazes de suprir a defesa antioxidante endógena, considerada insuficiente nestas condições, e de desempenhar uma função modulatória nesse processo oxidativo (MIDDLETON JÚNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Dentro desse contexto, os compostos polifenólicos têm recebido grande destaque nos últimos anos, em função da sua reconhecida capacidade de reagir com radicais livres e prevenir a oxidação de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídeos (LAUGHTON et al., 1989, 1991; PAYÁ; HALLIWELL; HOULT, 1992; CHANG et al., 1996; MARTÍN-ARAGÓN; BENEDI; VILLAR, 1996; LIMASSET et al., 1999; VAJRAGUPTA; BOONCHOONG; WONGKRAJANG, 2000). Entretanto, em processos oxidativos mediados por neutrófilos, a esterificação de grupos substituintes hidroxí de substâncias fenólicas tem sido descrita como uma modificação estrutural interessante, que parece contribuir para o aumento da atividade biológica de modulação das funções de neutrófilos e de outras células do sistema imune (CHEN et al., 2001; KABEYA et al., 2002; KUMAR et al., 2005).

No presente trabalho, foi avaliado o efeito de uma série de 3-fenilcumarinas hidroxiladas e acetoxiladas, análogas estruturalmente, sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados por ICs, com o intuito de investigar a relação estrutura-atividade e alguns possíveis mecanismos de ação dessas substâncias.

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado com o uso de duas sondas quimioluminescentes, lucigenina e luminol, que permitiram monitorar diferentes etapas do processo de produção de EROs. A primeira EROs produzida pelos neutrófilos ativados, via complexo da NADPH oxidase, é o $O_2^{\bullet-}$, que foi detectado especificamente pela lucigenina, gerando a $QLuc^{PMN}$. O $O_2^{\bullet-}$ é rapidamente convertido a H_2O_2 , que é utilizado como substrato pela MPO para a produção de espécies halogenadas, como HOCl e HOBr, e também reage com

outros radicais livres formados por reações químicas secundárias. As diversas EROs produzidas são detectadas pelo luminol, gerando a $QLlum^{PMN}$; porém, há maior sensibilidade para aquelas EROs envolvidas na reação MPO-H₂O₂-haletó (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

Na etapa inicial da investigação, onde o efeito das 3-fenilcumarinas foi avaliado sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos estimulados especificamente via receptores da classe FcγR, observou-se que tanto as substâncias hidroxiladas quanto as acetoxiladas inibiram esta função celular, de modo dependente da concentração. Este efeito inibitório parece não ser mediado pela toxicidade direta das 3-fenilcumarinas sobre as células não ativadas, uma vez que não foi observada diminuição estatisticamente significativa na viabilidade das células tratadas com as 3-fenilcumarinas na concentração de 50 μmol/L, quando comparada ao controle.

Verificou-se também que o efeito inibitório das 3-fenilcumarinas sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi dependente do número e da posição dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi no esqueleto 3-fenilcumarínico. Entretanto, dependendo da etapa do processo de produção de EROs pelos neutrófilos avaliada, as características estruturais que levaram a uma maior ou menor atividade inibitória das substâncias foram um pouco diferentes.

De modo geral, observou-se que as 3-fenilcumarinas que apresentaram valores de CI_{50} semelhantes sobre a $QLlum^{PMN}$ e a $QLluc^{PMN}$, ou seja, inibiram as duas etapas da produção de EROs avaliadas com a mesma intensidade, possuíam uma das seguintes características estruturais: (a) um ou dois grupos substituintes orto-diacetoxi (**C13a**, **C23a**, **C24a**); (b) apenas um grupo

substituintes orto-diidroxí (C13, C23); (c) grupos substituintes hidroxí ou acetoxí em C-6 e C-2' (C25, C25a). Esta semelhança da intensidade do efeito inibitório sobre a QLluc^{PMN} e a QLlum^{PMN} sugere que as 3-fenilcumarinas citadas provavelmente atuam sobre etapas do processo de ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos que são comuns à produção do O₂^{•-} e das demais EROs, como a ligação do IC à membrana, ativação de proteínas quinases e a desgranulação.

Por outro lado, as demais 3-fenilcumarinas avaliadas, que tiveram efeito inibitório maior sobre a QLluc^{PMN} do que sobre a QLlum^{PMN}, apresentaram uma das seguintes características estruturais: (a) apenas um grupo substituinte hidroxí ou acetoxí, em C-6 ou C-7 (C6, C6a, C11, C11a, C18, C18a); (b) dois grupos substituintes hidroxí ou acetoxí, sendo um deles em C-6 e o outro em C-3' ou C-4' (C19, C19a, C20, C20a); (c) dois grupos substituintes orto-diidroxí (C24). Os mecanismos envolvidos no maior efeito inibitório das 3-fenilcumarinas sobre a QLluc^{PMN}, quando comparado à QLlum^{PMN}, podem estar relacionados à inibição da formação e/ou da atividade do complexo enzimático da NADPH oxidase dos neutrófilos, bem como à reação inicial dessas substâncias com o O₂^{•-}, levando à formação de produtos com menor atividade inibitória sobre as etapas posteriores de produção de EROs pelos neutrófilos. Entretanto, esses possíveis mecanismos de ação serão investigados em trabalhos futuros.

Payá et al. (1993, 1994) relataram o aumento da atividade inibitória de cumarinas simples sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos e de ratos com a presença do grupo substituinte 6,7-orto-diidroxí ou 7,8-orto-

diidroxí. Estas características estruturais também têm sido relacionadas com um elevado efeito capturador de radicais livres, discutido de forma mais detalhada no item 5.2. Os resultados obtidos no presente trabalho, relativos à série de 3-fenilcumarinas, concordam em parte com esta observação da literatura. Verificou-se que a substância **C13**, que possui o grupo substituinte 6,7-*orto*-diidroxí foi uma das mais efetivas em inibir o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho. Entretanto, a presença desse grupo substituinte somada a outro grupo substituinte *orto*-diidroxí no anel 3-fenílico (**C24**) levou à diminuição do efeito biológico. Além disso, as outras duas 3-fenilcumarinas (**C13a**, **C24a**) que tiveram efeito inibitório maior que o flavonóide poliidroxilado **QUER**, possuíam os grupos *orto*-diidroxí acetilados (formando o grupo substituinte *orto*-diacetoxi). Esses resultados sugerem que outros fatores, além da presença de grupos substituintes hidroxí livres, estão envolvidos na atividade inibitória dessas 3-fenilcumarinas sobre a função celular mencionada.

Comparando-se a atividade das 3-fenilcumarinas hidroxiladas com as respectivas análogas acetoxiladas, observou-se que para aquelas substâncias com um ou dois grupos substituintes hidroxí ou acetoxi, a atividade inibitória das substâncias hidroxiladas sobre a QLuc^{PMN} foi semelhante à das análogas acetoxiladas. Entretanto, para a QLlum^{PMN}, a atividade as 3-fenilcumarinas hidroxiladas foi menor ou igual a das substâncias acetoxiladas, dependendo da posição dos grupos substituintes hidroxí ou acetoxi. Para as 3-fenilcumarinas com três ou quatro grupos substituintes hidroxí ou acetoxi, a atividade inibitória das substâncias acetoxiladas foi significativamente maior que a das análogas hidroxiladas, tanto para a QLuc^{PMN} quanto para QLlum^{PMN}.

Em alguns trabalhos da literatura, onde foi feita a comparação da atividade biológica de substâncias hidroxiladas e acetoxiladas em modelos experimentais celulares, foi observado que as substâncias contendo mais de um grupo substituinte acetoxi tendem a apresentar atividade biológica maior que a das respectivas análogas hidroxiladas. Por exemplo, Kumar et al. (2005) descreve que a atividade inibitória da 7,8-diacetoxi-4-metilcumarina sobre a expressão de ICAM-1 por células endoteliais, induzida por TNF- α , foi maior que a da análoga hidroxilada 7,8-diidroxi-4-metilcumarina. Chen et al. (2001) relata que a 3,5,7,3',4'-pentaacetoxiflavona (análoga acetoxilada da **QUER**) promoveu uma inibição da síntese de prostaglandinas e da produção de óxido nítrico por macrófagos maior que a **QUER**. Por outro lado, para as cumarinas monoidroxiladas, como a 7-hidroxycumarina, a mudança do grupo substituinte hidroxí para acetoxi parece não influenciar na inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho estimulados por zimosan opsonizado (KABEYA et al., 2002) e na expressão de ICAM-1 por células endoteliais (KUMAR et al., 2005).

O aumento da atividade biológica das substâncias tri ou tetraacetoxiladas em relação às análogas hidroxiladas pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao provável aumento da lipofilicidade promovido pela acetilação dos grupos substituintes hidroxí, que tende a ser maior com o aumento do número desses grupos substituintes na molécula, conforme sugerem os resultados preliminares da análise quantitativa de relação estrutura-atividade (dados não apresentados). Além disso, esse aumento de lipofilicidade pode também contribuir para o aumento da biodisponibilidade intracelular das substâncias acetoxiladas.

A relação direta entre o aumento da lipofilicidade e o aumento da atividade inibitória de flavonóides sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi observada por Moreira (2004), Tauber (1984) e Krol et al. (1994). Vuotto et al. (2003) observou que a esterificação da catequina com ácido propiônico ou ácido valérico levou ao aumento da atividade inibitória sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por PMA, que foi atribuído à maior biodisponibilidade intracelular dessas substâncias.

Como a maioria das 3-fenilcumarinas contendo um ou dois grupos substituintes acetoxi teve atividade inibitória semelhante à das análogas hidroxiladas, pode-se sugerir a ocorrência de hidrólise intracelular do(s) grupo(s) substituinte(s) acetoxi, mediada por esterases citoplasmáticas dos neutrófilos, levando à formação de produtos hidroxilados. Essa possível hidrólise enzimática ocorreria conforme proposto para a sonda fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), amplamente utilizada para medir a produção intracelular de peróxido de hidrogênio por neutrófilos. Tem sido sugerido que o DCFH-DA penetra na célula e é desacetilado a diclorofluoresceína (DCFH) por enzimas citosólicas; assim, a forma hidroxilada (DCFH) fica retida dentro das células, onde serve de substrato para oxidação pelo peróxido de hidrogênio, gerando um produto intracelular altamente fluorescente (BASS et al., 1983).

Esta hipótese de hidrólise intracelular é reforçada pela observação de que o efeito inibitório da 3-fenilcumarina acetoxilada **C24a** sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos tendeu a diminuir com o aumento do tempo de pré-tratamento dessas células. Provavelmente, ocorre a desacetilação de **C24a**,

formando a substância hidroxilada **C24**, que foi significativamente menos ativa neste modelo experimental. Por outro lado, para a 3-fenilcumarina **C13a**, a provável desacetilação parece não influenciar na atividade inibitória, uma vez que o efeito dessa substância mostrou uma tendência de se manter com o aumento do tempo de pré-tratamento das células. Além disso, a intensidade do efeito inibitório da substância **C13a** sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi semelhante ao da sua análoga hidroxilada **C13**.

A mudança dos grupos substituintes hidroxí para metoxi, que não são facilmente hidrolisados pelas enzimas dos neutrófilos, promoveu uma diminuição do efeito inibitório de cumarinas simples (KABEYA et al., 2002) e de flavonóides (KANASHIRO et al., 2004) sobre o metabolismo oxidativo dessas células, sugerindo que a forma hidroxilada é responsável pela atividade biológica.

Como parte da investigação dos mecanismos de ação das 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a**, o efeito inibitório dessas substâncias foi avaliado sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados via receptores de membrana das classes FcγR e/ou CR. De modo geral, observou-se que a intensidade do efeito inibitório das três 3-fenilcumarinas, tanto sobre a $QLluc^{PMN}$ quanto sobre a $QLlum^{PMN}$, tendeu a ser dependente da classe de receptor de membrana ativado somente nas concentrações menores que a CI_{50} . Resultados semelhantes foram observados por Moreira (2004), para um grupo de flavonóides. Entretanto, o pequeno número de medidas realizado, bem como a grande dispersão dos valores de porcentagem de inibição da $QLluc^{PMN}$ e da $QLlum^{PMN}$, observada em algumas das concentrações das 3-fenilcumarinas

avaliadas, não possibilitaram uma análise mais precisa dos resultados. Portanto, são necessários experimentos adicionais para a confirmação desses resultados.

Embora as 3-fenilcumarinas **C13**, **C13a** e **C24a** tenham inibido o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, eles não influenciaram na capacidade fagocítica dessas células, mediada por receptores da classe Fc γ R. Esse efeito inibitório seletivo sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos foi semelhante ao descrito para a QUER por Oliveira et al. (2002) e Moreira (2004). Entretanto, impacto biológico deste padrão de atividade para o hospedeiro ainda precisa ser investigado, uma vez que a capacidade da célula em digerir microrganismos e outros antígenos fagocitados pode estar comprometida, devido à inibição da produção de EROs.

De acordo com Nathan (2006), uma estratégia terapêutica interessante para o controle do processo inflamatório mediado por neutrófilos é a inibição seletiva e parcial da NADPH oxidase, de tal modo que a atividade microbicida da célula não seja comprometida. Segundo esse autor, a inibição total do metabolismo oxidativo levaria à imunossupressão, e o conseqüente aumento da susceptibilidade do hospedeiro a infecções.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as três 3-fenilcumarinas mais ativas (**C13**, **C13a**, **C24a**), para as quais alguns possíveis mecanismos de ação foram investigados, atuam predominantemente como moduladores negativos do metabolismo oxidativo dos neutrófilos de coelho estimulados por ICs. Entretanto, estudos adicionais precisam ser realizados para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas substâncias.

Tendo em vista a diversidade de substâncias e enzimas produzidas e/ou liberadas pelos neutrófilos ativados durante um processo inflamatório (como EROs, enzimas lisossomais e mediadores pró- e anti-inflamatórios) e a complexa rede de funções fisiológicas em que esses componentes estão inseridos, torna-se difícil prever o impacto biológico da modulação seletiva de apenas uma das funções dos neutrófilos.

5.2. Efeito modulatório das 3-fenilcumarinas nos modelos experimentais não celulares

As peroxidases de plantas e as de origem animal catalisam a produção de radicais livres a partir de substratos aromáticos e inorgânicos, os quais exercem importante papel em processos fisiológicos. Em plantas, os produtos radicalares estão envolvidos na produção de hormônios de crescimento e de metabólitos secundários para a defesa contra microrganismo e insetos, e também são essenciais para as reações de cross-linking do processo de biossíntese de suberina e de lignina (TAKAHAMA; YOSHITAMA, 1998; HIRAGA et al., 2001; VEITCH, 2004). Em mamíferos, esses produtos radicalares participam de processos de sinalização intracelular e biossíntese de eicosanóides pró-inflamatórios, além de mediar a morte de microrganismos ingeridos por fagócitos profissionais (BABIOR, 2000; ZHANG et al., 2002; KLEBANOFF, 2005).

Apesar da importância fisiológica das peroxidases e de seus produtos radicalares, a sua contribuição para a lesão tecidual observada em doenças

inflamatórias crônicas, como aterosclerose, asma e artrite reumatóide, tem sido extensamente relatada (BABIOR, 2000; KLEBANOFF, 2005; OBINGER, 2006). Dentro desse contexto, uma das estratégias terapêuticas que vêm sendo estudada para a modulação dessas doenças é a administração de substâncias fenólicas, que são conhecidas capturadoras de radicais livres (MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Entretanto, numerosas substâncias dessa classe podem também atuar como substratos para as peroxidases, doando hidrogênio para a enzima e levando à formação de produtos radicalares, os quais, dependendo da sua estrutura química, podem ser suficientemente reativos para oxidar biomoléculas e contribuir para a amplificação da lesão em processos inflamatórios (THORPE; KRICKA, 1986; VISSER et al., 2003; VEITCH, 2004).

Analisando-se o conjunto de resultados relacionados à atividade da série de 3-fenilcumarinas sobre a reação enzimática HRP-H₂O₂-luminol, observou-se que as substâncias contendo o grupo substituinte orto-diidroxí (C13, C23, C24) foram as inibidoras mais efetivas. As 3-fenilcumarinas acetoxiladas, bem como as substâncias contendo grupos substituintes hidroxí em outras posições, tiveram atividade inibitória significativamente menor. Além disso, não foi observado efeito pró-oxidante estatisticamente significativo, dentro das condições experimentais empregadas.

Os estudos de modelagem molecular por docking sugerem que a interação mais efetiva entre as 3-fenilcumarinas contendo o grupo substituinte orto-diidroxí e o grupo heme do sítio ativo da HRP, quando comparada à das demais substâncias avaliadas, pode ser um dos fatores envolvidos na inibição da

QL^{HRP}. Além disso, os radicais fenóxido resultantes da oxidação desses grupos substituintes orto-diidroxí podem ser facilmente estabilizados pela formação de quinonas, que são quimicamente menos reativas e provavelmente não oxidam o luminol, levando à diminuição da QL^{HRP} medida (THORPE; KRICKA, 1986). Esses mecanismos, somados ao fato de que apenas um grupo orto-diidroxí é suficiente para capturar os dois elétrons envolvidos no ciclo catalítico da HRP (HENRIKSEN; SMITH; GAJHEDE, 1999), podem ter contribuído para elevada inibição da atividade da enzima observada.

A semelhança entre as características estruturais das substâncias que inibiram a atividade da HRP e aquelas que foram capazes de reagir com o radical livre DPPH sugere também que a reação das 3-fenilcumarinas com radicais livres formados pela enzima pode ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da QL^{HRP}.

Takahama e Egashira (1991) relataram que as características estruturais de flavonóides que contribuem para uma maior capacidade doadora de elétrons para peroxidases são semelhantes às descritas por Bors et al. (1990) para a atividade capturadora de radicais livres: a 5,7-diidroxilação no anel A, a presença do grupo orto-diidroxí no anel B e a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, conjugada com a função 4-oxo. Dentre elas, os resultados do presente trabalho reforçam a importância da presença do grupo substituinte orto-diidroxí, uma vez que as 3-fenilcumarinas contendo este grupo substituinte foram tão efetivas quanto o flavonóide **QUER** (que possui grupo substituinte 3',4'-orto-diidroxí no anel B) em inibir a atividade da HRP e em capturar o radical livre DPPH.

A reconhecida capacidade das substâncias fenólicas de capturar radicais livres parece também contribuir para a inibição da síntese de prostaglandinas pela ciclooxigenase, uma vez que essa enzima catalisa a peroxidação controlada e estereoespecífica do ácido araquidônico, mediada por radicais peroxílicos (HOULT; MORONEY; PAYÁ, 1994; HOULT; PAYÁ, 1996; GARCÍA-ARGÁEZ et al., 2000). Assim, a inibição da atividade peroxidativa da ciclooxigenase pelas substâncias fenólicas pode ser um mecanismo importante para o seu efeito antiinflamatório.

Apesar das substâncias fenólicas serem os substratos preferenciais para a HRP, devido à maior facilidade de doação de elétrons, alguns ésteres também são metabolizados por essa enzima, tais como o éster etílico do ácido formilfenilacético e derivados acetilados do ácido hidroxâmico. Entretanto, a velocidade de reação das substâncias esterificadas parece ser menor que a de suas análogas hidroxiladas (KALYNARAMAN; MAHADEVAN; KUMAR, 1975; CORBETT, M.; CORBETT, B., 1987). Na série de 3-fenilcumarinas estudadas foi observado que a substância acetoxilada **C24a** inibiu a QL^{HRP}, porém a intensidade desse efeito inibitório foi significativamente menor que o da sua análoga hidroxilada **C24**.

Para uma série de 4-metilcumarinas, Raj et al. (1998a) e Kumar et al. (2005) observaram que as substâncias com grupo 7,8-*orto*-diidroxí foram mais eficientes que as análogas acetoxiladas em capturar o radical livre DPPH, mas tiveram atividades inibitórias semelhantes sobre a peroxidação lipídica microssomal mediada por radicais livres gerados por reações químicas ou enzimáticas. A semelhança de atividade entre as 4-metilcumarinas hidroxiladas

e as acetoxiladas foi atribuída à hidrólise dos grupos substituintes acetoxi, produzindo os derivados hidroxilados, mediada por deacetilases presentes nos sistemas microssomais, ou por radicais livres iniciadores, como superóxido ou peróxido. Esta última hipótese foi confirmada posteriormente por Raj et al. (1999b), empregando metodologia de radiólise de pulso, usando um radical derivado da azida como iniciador da reação.

Além da capacidade de reagir com radicais livres, um dos possíveis mecanismos de ação descrito para substâncias acetoxiladas é a transferência enzimática de grupos acetil para alvos celulares (proteínas, enzimas). Por exemplo, Roth e Majerus (1975) relatam que o mecanismo de ação da aspirina sobre plaquetas é mediado por acetilação de uma determinada fração protéica *in vitro*. Foi relatado também que a transacetilase microssomal de ratos transfere o grupo acetil da 7,8-diacetoxi-4-metilcumarina para o sítio ativo do citocromo P-450, levando à inativação enzimática, e também para a NADPH citocromo c redutase, causando ativação enzimática (RAJ et al., 1999a).

A presença do grupo substituinte *orto*-diidroxí em cumarinas simples, como a fraxetina (7,8-diidroxí-6-metoxicumarina), a esculetina (6,7-diidroxícumarina) e a 4-metilesculetina (6,7-diidroxí-4-metilcumarina), tem sido relacionada ao efeito inibitório dessas substâncias sobre a peroxidação lipídica e ao efeito quelante de ferro (MARTÍN-ARAGÓN et al., 1996). Recentemente, a 6,7-diidroxí-3-fenilcumarina foi descrita como inibidora da peroxidação lipídica plasmática em ratos (TUNALI et al., 2004).

Pode-se observar que a maior ou menor capacidade de cumarinas hidroxiladas e acetoxiladas em reagir com radicais livres depende não só do

número e posição dos grupos substituintes no esqueleto cumarínico, mas também do modelo experimental utilizado para a avaliação da atividade biológica. Halliwell (1990) relatam que qualquer substância antioxidante é de fato um agente redox, capaz de diminuir ou aumentar a produção de radicais livres, dependendo da sua concentração, da fonte de radicais livres, da sua localização no meio biológico e das condições gerais do ensaio.

5.3. Considerações finais

O conjunto de resultados deste trabalho sugere que a atividade das 3-fenilcumarinas estudadas sobre as funções efetoras de neutrófilos é dependente de suas estruturas químicas, e que as propriedades físico-químicas envolvidas na modulação da atividade biológica nos modelos experimentais celulares e modelos não-celulares parecem ser diferentes. No primeiro, a intensidade do efeito inibitório parece ser mais influenciada pela lipofilicidade das substâncias, enquanto que no segundo, pela capacidade doadora de elétrons.

Uma vez que a lesão tecidual observada em doenças mediadas por ICs é causada tanto pela exacerbada ativação neutrofílica, quanto pela liberação de seus produtos tóxicos (EROs, peroxidases, proteases) para o meio extracelular, seria interessante que uma mesma molécula atuasse efetivamente nos alvos intra e extracelulares. Para essa finalidade, a substância ideal precisaria possuir uma combinação adequada de propriedades eletrônicas e lipofílicas.

Dentro da série de 3-fenilcumarinas estudadas, a substância C13 parece possuir esses requisitos, devido à sua elevada atividade inibitória sobre o

metabolismo oxidativo dos neutrófilos e sobre a atividade da peroxidase, e ao elevado efeito capturador de radicais livres. Entretanto, são necessários estudos adicionais para a confirmação dessa hipótese, e para o melhor entendimento do mecanismo de ação dessa 3-fenilcumarina. Nesse sentido, estão em andamento outros estudos de modelagem molecular, bem como a análise quantitativa da relação estrutura-atividade.

6. Conclusão

O conjunto de resultados deste trabalho sugere que as atividades biológicas das 3-fenilcumarinas, avaliadas nos sistemas experimentais celulares e não-celulares, foram dependentes de suas estruturas químicas, sendo que os requisitos estruturais para a modulação positiva ou negativa de cada atividade biológica estudada foram diferentes.

Considerando-se a atividade biológica de inibição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados por ICs, observou-se que, de modo geral, as 3-fenilcumarinas sem grupos substituintes hidroxí ou acetoxi não tiveram efeito inibitório significativo, na maior concentração avaliada (50 $\mu\text{mol/L}$). Por outro lado, a presença do grupo substituinte 3',4'-metilenodioxi e do grupo substituinte 6,7-*orto*-diidroxí (**C13**) ou 6,7-*orto*-diacetoxi (**C13a**) na mesma molécula, ou a presença do grupo substituinte 6,7,3',4'-tetraacetoxi (**C24a**), conferiram às substâncias uma atividade inibitória maior que a **QUER** sobre a QLuc^{PMN} e a $\text{QLlum}^{\text{PMN}}$. Para as demais substâncias avaliadas, que foram tão ou menos ativas que a **QUER**, a influência do número e da posição dos grupos substituintes hidroxí e acetoxi sobre a intensidade do efeito biológico de inibição da QLuc^{PMN} e foi diferente para a $\text{QLlum}^{\text{PMN}}$.

Para a QLuc^{PMN} , a presença de apenas um grupo substituinte hidroxí ou acetoxi na molécula, em C-6 (**C18**, **C18a**) ou C-7 (**C11**, **C11a**), levou a uma atividade inibitória significativamente menor que a **QUER**. Por outro lado, as substâncias 6-hidroxiladas que possuíam grupo substituinte hidroxí ou 3',4'-metilenodioxi no anel 3-fenílico (**C6**, **C19**, **C20**, **C25**), bem como suas respectivas análogas acetoxiladas (**C6a**, **C19a**, **C20a**, **C25a**), e as substâncias

com o grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxí (C23 e C24), foram tão ativas quanto a QUER em inibir a QLluc^{PMN}.

Para a QLlum^{PMN}, as 3-fenilcumarinas com grupo substituinte 6,2'-diidroxí (C25) ou 6,3',4'-triidroxí (C23), bem como as análogas acetoxiladas dessas substâncias (C25a, C23a), foram tão ativas quanto a QUER. As demais 3-fenilcumarinas avaliadas foram significativamente menos ativas que a QUER em inibir a QLlum^{PMN}.

A acetilação do grupo substituinte 3',4'-*orto*-diidroxí (C23 e C24) promoveu aumento da atividade inibitória sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos estimulados por ICs, sugerindo que a lipofilicidade do composto é relevante para esta atividade biológica. Entretanto, para a modulação da atividade de peroxidases (HRP) isoladas e a captura de radicais livres (DPPH), o número de grupos substituintes hidroxí parece ser a característica estrutural determinante para uma maior atividade, sugerindo a importância de fatores eletrônicos.

Referências

ADAMIK, B.; ZIMECKI, M.; WLASZCZYK, A.; BEREZOWICZ, P.; KUBLER, A. Lactoferrin effects on the in vitro immune response in critically ill patients. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, Basel, v.46, n.3, p.169–176, 1998.

ADEREN, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.17, p.593–623, 1999.

ALLEN, L.A.H. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p.1329–1335, 2003.

ALLISON, A.C.; DAVIES, P.; PETRIS, S. de. Role of contractive microfilaments in macrophage movement and endocytosis. **Nature: New Biology**, London, v.232, p.153–155, 1971.

ALONSO, A.; BAYÓN, Y.; MATEOS, J.J.; CRESPO, M.S. Signaling by leukocyte chemoattractant and Fc γ receptors in immune-complex tissue injury. **Laboratory Investigation**, New York, v.78, n.4, p.377–392, 1998.

ALVES, C.M.O.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fc γ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, London, v.60, p.601–608, 2003.

ALVES, C.M.O.S. **Avaliação da participação de receptores de imunoglobulina G (Fc γ R) e do complemento (CR1, CR3) na produção de ânions superóxidos por neutrófilos normais e de lupus eritematoso sistêmico**. 2000. 174f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, New York, v.47, p.415–433, 1998.

ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355–1363, 1998.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v.93, n.5, p.1464–1475, 1999.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, Marion, v.109, n.1, p.33–44, 2000a.

BABIOR, B.M. The NADPH oxidase of endothelial cells. **IUBMB Life**, London, v.50, n.4/5, p.267–269, 2000b.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin–8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, New York, v.55, p.97–179, 1994.

BAINTON, D.F.; ULLYOT, J.L.; FARQUHAR, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.134, p.907–934, 1971.

BALDRIDGE, C., GERARD, R. The extra respiration of phagocytosis. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.103, p.235-236, 1933.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001. p.15-51: Aspectos gerais da ação dos fármacos. Cap.1.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; ARAÚJO JÚNIOR, J.X. Os uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. 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. Porto Alegre/Florianoópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap.8, p.147-210.

BASS, D.A.; PARCE, J.W.; DECHATELET, L.R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M.C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, n.4, p.1910-1917, 1983.

BAZZONI, F.; CASSATELLA, M.A.; ROSSI, F.; CESKA, M.; DEWALD, B.; BAGGLIOLINI, M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil activating peptide-1/interleukin-8. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.173, p.771-774, 1991.

BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, A.T.; SZOKE, H.; HENRIKSEN, A.; HADJU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, London, v.417, p.463-468, 2002.

BIASI, D.; CARLETTO, A.; CARAMASCHI, P.; BONELLA, F.; BAMBARA, V.; PACOR, M.L.; BAMBARA, L.M. Neutrophils in rheumatoid inflammation. **Recenti Progressi in Medicina**, v.94, p.25-30, 2003.

BILLIAU, A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. **Advances in Immunology**, New York, v. 62, p.61-130, 1996.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, New York, v.181, p.1199-1200, 1958.

BORREGAARD, N.; CHRISTENSEN, L.; BJERRUM, O.W.; BIRGENS, H.S.; CLEMMENSEN, I. Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.85, p.408, 1990.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, New York, v.89, n.10, p.3503-3521, 1997.

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.

BRAVO B., J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENES, T.A.; MUÑOZ, O.V.; CALLAPA, J.; MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v.50, n.1, p.71-74, 1999.

BROWN, E.J. Phagocytosis. **BioEssays**, Cambridge, v.17, n.2, p.109-117, 1995.

BROWN, J.P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v.75, p.243-277, 1980.

CACCAVO, D.; PELLEGRINO, N.M.; ALTAMURA, M.; RIGON, A.; AMATI, L.; AMOROSO, A.; JIRILLO, E. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. **Journal of Endotoxin Research**, Cambridge, v.8, p. 403-417, 2002.

CAI, T.Q.; WRIGHT, S.D. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, α M β 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.184, p.1213-1223, 1996.

CASATELLA, M.A.; GASPERINI, S.; CALZETI, F.; BERTAGNIN, A.; LUSTER, A.D.; McDONALD, P.E. Regulated production of the interferon- γ -inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.27, p.111-115, 1997.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology**, New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHANG, W.-S.; LIN, C.-C.; CHUANG, S.-C.; CHIANG, H.-C. Superoxide anion scavenging effect of coumarins. **American Journal of Chinese Medicine**, Garden City, v.24, n.1, p. 11-17, 1996.

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.

CHENG, J.-F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KACHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A. SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A.M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- α inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.14, p.2411-2415, 2004.

CHEUNG, K.; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, n.5, p.2324-2329, 1983.

CHIMENTI, F.; SECCI, D.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; BEFANI, O.; TURINI, P.; ALCARO, S.; ORTUSO, F. Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.14, p.3697-3703, 2004.

CHU, C.-Y.; TSAI, Y.-Y.; WANG, C.-J.; LIN, W.-L.; TSENG, T.-H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.416, n.1/2, p.25-32, 2001.

CORBETT, M.D.; CORBETT, B.R. HRP-catalyzed bioactivation of carcinogenic hydroxamic acids: the greater reactivity of glycolyl-versus acetyl-derived hydroxamic acids. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.63, p.249-264, 1987.

COS, P.; HERMANS, N.; CALOMME, M.; MAES, L.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.55, p.1291-1297, 2003.

DAËRON, M. Fc receptor biology. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.15, p.203-234, 1997.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.232, n.1/2, p.3-14, 1999.

DAVIES, K.A. Michael Mason Prize Essay 1995: complement, immune complexes and systemic lupus erythematosus. **British Journal of Rheumatology**, London, v.35, n.1, p.5-23, 1996.

DAVIES, K.J.A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair and replacement systems. **IUBMB Life**, London, v.50, n.4/5, p.279-289, 2000.

DOUCET, C.; POCHET, L.; THIERRY, N.; PIROTTE, B.; DELARGE, J.; REBOUD-RAVAUX, M. 6-Substituted 2-oxo-2-H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v.42, p.4161-4171, 1999.

DURE, L.S.; CORMIER, M.J. Studies on the Bioluminescence of *Balanoglossus biminiensis* Extracts. III. A kinetic comparison of luminescent and nonluminescent peroxidation reactions and a proposed mechanism for peroxidase action. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.239, p.2351-2359, 1964.

EL OURIAGHLI, F.; FUJIWARA, H.; MELENHORST, J. J.; SCONOCCHIA, G.; HENSEL, N.; BARRETT, A. J. Neutrophil elastase enzymatically antagonizes the in vitro action of G-CSF: implications for the regulation of granulopoiesis. **Blood**, New York, v.101, p.1752-1758, 2003.

ERNST, J.D.; ROSALES, J.L.; ZIMMERLI, S. Calcium signalling initiated by CR1 (CD35) crosslinking is mediated by phagocyte Fc gamma receptors in cis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.209, v.3, p.1032-1038, 1995.

FADEEL B, ÅHLIN A, HENTER J, ORRENIUS S, AND HAMPTON MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. **Blood**, New York, v.92, p.4808-4818, 1998.

FAHEY, J.L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R.. The immunoglobulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins: 7S2-, 7S1-, 1A ,2A- and 18S1M- Globulins. **Journal of Experimental Medicine**, New York. v.120, p.223, 1964.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, Paris, 5, 1317-1327, 2003.

FELTER, S.P.; VASSALO, J.D.; CARLTON, B.D.; DASTON, G.P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.44, p.462, 475, 2006.

FERNÁNDEZ, N.; JANCAR, S.; CRESPO, M.S. Blood and endothelium in immune complex-mediated tissue injury. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.25, n.10, p.512-517, 2004.

FORMAN, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.48, p.669-680, 1986.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

FOTI, M.; PIATELLI, M.; BARATTA, M.T.; RUBERTO, G. Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system: structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.44, p.497-501, 1996.

GADD, K.J.; REID, K.B.M. The binding of complement component C3 to antibody-antigen aggregates after activation of the alternative pathway in human serum. **Biochemical Journal**, London, v.195, p.471-480, 1981.

GARCÍA-ARGÁEZ, A.N.; APAN, T.O.R.; DELGADO, H.P.; VELÁZQUEZ, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPS ear mice model. **Planta Medica**, Stuttgart, v.66, n.3, p.279-281, 2000.

GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; RUSSO, M.P.; DE GIRONCOLI, M.; CASSATELLA, M.A. Regulation of GRO α production in human granulocytes. **Journal of Inflammation**, v.45, p.143-151, 1995.

GASPERINI, S.; MARCHI, M.; CALZETTI, F.; LAUDANNA, C.; VICENTINI, L.; OLSEN, H.; MURPHY, M.; LIAO, F.; FARBER, J.; CASSATELLA, M.A. Gene expression and production of the monokine induced by IFN- γ (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.162, n.8, p.4928-4937, 1999.

GHATE, M.; MANOHAR, D.; KULKARNI, V.; SHOBHA, R.; KATTIMANI, S.Y. Synthesis of vanillin ethers from 4-(bromomethyl) coumarins as anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.38, p.297-302, 2003.

GHATE, M.; KUSANUR, R.A.; KULKARNI, M.V. 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.

GNERRE, C.; CATTO, M.; LEONETTE, F.; WEBER, P.; CARRUPT, P.-A.; ALTOMARE, C.; CAROTTI, A.; TESTA, B. Inhibition of monoamine oxidases by functionalized coumarin derivatives: biological activities, QSARs, and 3-D-QSARs. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v.43, p.4747-4758, 2000.

GOERS, J. **Immunochemical techniques laboratory manual**. San Diego, Academic Press, 1993.

GOUWY, M.; STRUYF, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v.16, p.561–580, 2005.

GRAPH Pad Prism version 3.00 for Windows. San Diego: GraphPad Software, 1999. (www.graphpad.com)

GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Coumarins in the Rutaceae. **Phytochemistry**, Oxford, v.17, p.845–864, 1978.

GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosis. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.5, p.93–99, 1995.

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 Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.16, p.2528–2531, 2006.

GUDMUNDSSON, G.H.; AGERBERTH, B. Neutrophils antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.232, p.45–54, 1999.

GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.57, n.4, p.518–520, 1994.

GUZZO, C.A.; LAZARUS, G.S.; WERTH, V.P. Farmacologia dermatológica. In: GOODMAN, L.S. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana, 1996. Cap.64, p.1181–1197.

HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; New diaminoether coumarinic derivatives with antiinflammatory activity. **Arzneimittel-Forschung-Drug Research**, Aulendorf, v.50(II), p.631–635, 2000.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, London, v.9, n.1, p.1–32, 1990.

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

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, New York, v.92, n.9, p.3007–30017, 1998.

HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Redox regulation of neutrophil function. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, v.4, n.1, p.1–3, 2002.

HARE, R. The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of penicillin. **Medical History**, v.27, p.347–372, 1983.

HART, B.A.T.; CHING, T.R.A.M.I.V.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. How flavonoids inhibit the generation of luminol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophil. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.73, p.323-335, 1990.

HEBERT, L.A. The clearance of immune complexes from circulation of man and other primates. **American Journal of Kidney Diseases**, New York, v.17, p.352-361, 1991.

HEERINGA, P.; HUUGEN, D.; TERVAERT, J.W.C. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and leukocyte-endothelial interactions: a sticky connection? **Trends in Immunology**, Oxford, v.26, n.11, p.561-564, 2005.

HENRIKSEN, A.; SCHULLER, D.J.; MENO, K.; WELINDER, K.G.; SMITH, A.T.; GAJHEDE, M. Structural Interactions between Horseradish Peroxidase C and the Substrate Benzhydroxamic Acid Determined by X-ray Crystallography, **Biochemistry**, Washington, v.37, n.22, p.8054-8060, 1998.

HENRIKSEN, A.; SMITH, A.T.; GAJHEDE, M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.274, n.49, p.35005-35011, 1999.

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.

HENSON, P.M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, New York, v.6, n.12, p.1179-1181, 2005.

HEYWORTH, P.G.; CROSS, A.; CURNUTTE, J.T. Chronic granulomatous disease. **Current Opinion in Immunology**, London, 15:578-584, 2003

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.42, p.462-468, 2001

HIRSCH, J. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.103, p.589-621, 1956.

HOFFMANN, E.; DITTRICH-BREIHZOLZ, O.; HOLTMANN, H.; KRACHT, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.72, p.847-855, 2002.

HOULT, J.R.S.; MORONEY, M.A.; PAYÁ, M. Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. **Methods in Enzymology**, New York, v.234, p.443-454, 1994.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, Bristol, v. 27, n.4, p.713-722, 1996.

INSIGHT II Modeling Environment, version 2000. **User Guide**. San Diego: Molecular Simulations Inc., 2000. (www.accelrys.com)

IYER, G.Y.N.; ISLAM, M.F.; QUASTEL, J.H. Biochemical aspects of phagocytosis. **Nature**, London, v.192, p. 535-541, 1961.

JANCAR, S.; CRESPO, M.S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. **Trends in Immunology**, Oxford, v.26, n.1, p.48-55, 2005.

JARVIS, J.N.; DIEBOLD, M.M.; CHADWELL, M.K.; IOBIDZE, M.; MOORE, H.T. Composition and biological behaviour of immune complexes isolated from synovial fluids of patients with juvenile rheumatoid arthritis (JRA). **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.100, p.514-518, 1995.

JARVIS, J.N.; XU, C.S.; WANG, W.; PETTY, H.R.; GONZALEZ, M.; MORSSY, N.; WAXMAN, F.; DEL RIO, A.Q. Immune complex size and complement regulate cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Clinical Immunology**, Orlando, v.93, n.3, p.274-282, 1999.

JOHNSON, K.J.; VARANI, J.; SMOLEN, J.E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, New York, v.57, p.1- 46, 1992.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. **Immunochemistry in practice**. 2.ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987.

KABEYA, L.M.; MARCHI, A.A.-de.; KANASHIRO, A.; LOPES, N.P.; SILVA, C.H.T.P.-da; PUPO, M.T.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Horseradish peroxidase-mediated pro- and anti-oxidative effect of 3-phenylcoumarin derivatives: synthesis and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. (submetido).

KABEYA, L.M.; KANASHIRO, A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SORIANI, F.M.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, Westbury, v.111, n.1-4, p.103-114, 2002.

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

KALYANARAMAN, V.S.; MAHADEVAN, S.; KUMAR, S.A. Oxidase-peroxidase enzymes of *Datura innoxia*. Oxidation of formylphenylacetic acid ethyl ester. **Biochemical Journal**, London, v.149, p.565-576, 1975.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A.C.M.; LOPES, N.P.; LOPES, J. L. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation with immune complexes. **Phytotherapy Research**. London: v.18, p.61-65, 2004.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; GRAEL, C.F.F.; JORDÃO, C.O.; AZZOLINI, A.E.C.S.; LOPES, J.L.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohlii*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.58, p.853-858, 2006.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.142, p 239-254, 2003.

KANG, T.-H; PAE, H.-O.; JEONG, S.-J.; YOO, J.-C.; CHOI, B.-M.; JUN, C.-D.; CHUNG, H.-T.; MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; KIM, Y.-C. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.65, n.5, p.400- 403, 1999.

KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, v.4, n.1, p.49-60, 2002.

KASAHARA, Y.; IWAI, K.; YACHIE, A.; OHTA, K.; KONNO, A.; SEKI, H.; MIYAWAKI, T.; TANIGUICHI, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95(Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. **Blood**, New York, v.89, p.1748-1753, 1997.

KASAMA, T.; STRIETER, R.M.; LUKACS, N.W.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.152, p.3559-3569, 1994.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation and Allergy**, Pennington, v.4, n.3, p.273-279, 2005.

KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANI, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S. G.; CHAKRABARTY, A. N. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**, Aulendorf, v.51(I), p.67-71, 2001.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v.23, n.1, p.21-48, 1993.

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, p.3584-3587, 2005.

KIM, J.-D; LIU, L.; MEYDANI, M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.17, n.3, p.165-176, 2006.

KIMBERLY, R.P.; SALMON, J.E.; EDBERG, J.C. Receptors for immunoglobulin G: molecular diversity and implications for disease. **Arthritis and Rheumatism**, New York, v.38, p.306-314, 1995.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; ARICHI, S.; BABA, K.; KOZAWA, M. Inhibition of the formation of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid from arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes by various coumarins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.834, n.2, p.224-229, 1985.

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

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

KOCZULLA, R., VON DEGENFELD, G., KUPATT, C., KROTZ, F., ZAHLER, S., GLOE, T., ISSBRUCKER, K., UNTERBERGER, P., ZAIYOU, M., LEBHERZ, C., KARL, A., RAAKE, P., PFOSSER, A., BOEKSTEGERS, P., WELSCH, U., HIEMSTRA, P. S., VOGELMEIER, C., GALLO, R. L., CLAUSS, M., BALS, R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.111, p.1665-1672, 2003.

KOFINAS, C.; CHINOI, I.; LOUKIS, A.; HARVALA, C.; ROUSSAKIS, C.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. **Planta Medica**, Stuttgart, v.64, n.2, p.174-176, 1998.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; WOERDENBAG, H. J.; VAN UDEN, W.; PRAS, N. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tubingen, v. 52c, n.3/4, p.240-244, 1997.

KONTOGIORGIS, C.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v.18, n.1, p.63-69, 2003.

KONTOGIORGIS, C.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives with a 7-azomethine linkage. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.14, p.611-614, 2004.

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

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.41, p.121-126, 1994.

KUMAR, A.; SINGH, B.K.; TYAGI, R.; JAIN, S.K.; SHARMA, S.K.; PRASAD, A.K.; RAJ, H.G.; RASTOGI, R.C.; WATTERSON, A.C.; PARMAR, V.S. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylcoumarins. Part 11: comparison of the specificities of acetoxy derivatives of 4-methylcoumarin and 4-phenylcoumarin to acetoxycoumarins: protein transacetylase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.13, p.4300-4305, 2005.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. 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. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap.21, p.537-556.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London. v.227,p.680-685,1970.

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.37, p.423-453, 1999.

LAUGHTON, M.J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P.J.; HOULT, J.R.S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.38, n.17, p.2859-2865, 1989.

LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT, J.R.S.; HALLIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.42, n.9, p.1673-1681, 1991.

LEAL, L.K.; FERREIRA, A.A.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.; VIANA, G.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.70, n.2, p.151-159, 2000.

LEE, W.L.; HARRISON, R.E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p.1299-1306, 2003.

LEHRER, R.I.; GANZ, T.; SELSTED, M.E.; BABIOR, B.M.; CURNUTTE, J.T. Neutrophils and host defense. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.109, p.127-142, 1988.

LEHRER, R.L.; LICHTENSTEIN, A.K.; GANZ, T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.11, p.105-128, 1993.

LEKSTRON-HIMES, J.A.; GALLIN, J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.343, n.23, p.1703-1714, 2000.

LEVY, O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.76, p.909-925, 2004.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.186, p.8-18, 2002.

LI, Y.; ZHU, H.; TRUSH, M.A. Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemiluminogenic probes lucigenin and luminol. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1428, n.1, p.1-12, 1999.

LIMASSET, B.; LE DOUCEN, C.; DORE, J. C.; OJASOO, T.; DAMON, M. CRASTES DE PAULET, A. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils: multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.46, n.7, p.1257-1271, 1993.

LIMASSET, B.; OJASOO, T.; LE DOUCEN, C.; DORE, J-C. Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. **Planta Medica**, Stuttgart, v.65, n.1, p. 23-29, 1999.

LIPMAN, N.S.; PHILLIPS, P.A.; NEWCOMER, C.E. A comparison of ketamine/zylazine and ketamine/zylazine/acepromazine anesthesia in the rabbit. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.40, n.4, p.395-398, 1990.

LIU, Y.; SHAW, S.K.; MA, S. YANG, L.; LUSCINSKAS, F.W.; PARKOS, C.A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signalling events. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.172, p.7-13, 2004.

LIU, Z.-Q; YU, W.; LIU, Z.-L. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v.103, n.1/2, p.125-135, 1999.

LÖFGREN, R.; SERRANDER, L.; FORSBERG, M.; WILSSON, A.; WASTESON, A.; STENDAHL, O. CR3, Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1452, n.1, p.46-59, 1999.

LOPES, J.L.C.; LOPES, J.N.C.; HOLANDA, J.C.; VIEIRA, P.C. Ação quimioprofilática de alguns derivados cumarínicos sobre a esquistossomose. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v.13, p.201-206, 1976.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-20, 1984.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. The role of complement in the stimulation of lysosomal enzyme release by polymorphonuclear leucocytes induced by immune complexes of IgG and IgG. **Immunology**, Oxford, v.65, p.71-75, 1988.

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 complexes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v.47, p.53-58, 2002.

LUSTER, A.D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.338, p.436-445, 1998.

MAJERUS, P.W.; BROZE JÚNIOR, G.J.; MILETICH, J.P.; TOLLEFSEN, D.M. Fármacos anticoagulantes, trombolíticos e antiplaquetários. In: GOODMAN, L.S. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana, 1996. Cap.54, p.991-1005.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Neutrophils in human diseases. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.317, n.11, p.687-694, 1987.

MANTOVANI, B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.115, n.1, p.15-17, 1975.

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 Medicinal Chemistry**, New York, v.12, p.4823-4833, 2004.

MARINI, R.P.; AVISON, D.L.; CORNING, B.F.; LIPMAN, N.S. Ketamine/zylazine/butorphanol: a new anesthetic combination for rabbits. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.42, n.1, p.57-62, 1992.

MARRACK, P.; KAPLER, J.; KOTZIN, B.L. Autoimmune disease: why and where it occurs. **Nature Medicine**, New York, v.7, p.899-905, 2001.

MARTÍN-ARAGÓN, S.; BENEDI, J.; VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. **Phytotherapy Research**, London, v. 10, p.75-78, 1996.

MARZOCCHI-MACHADO, C M; POLIZELLO, A.C.M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The influence of antibody functional affinity o the effector functions involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, New York, v. 28, n.2-3, p.89-101, 1999.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ALVES, C.M.O.S.; AZZOLINI, A.E.C.S.; POLIZELLO, A.C.M.; CARVALHO, I.F.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Fc γ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, London, v.11, p.240-248, 2002.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.11, p.1995-2000, 2003.

McCUE, P.; SHETTY, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.44, p.361-367, 2004.

McPHAIL, L.C.; STRUM, S.L.; LEONE, P.A. The neutrophil respiratory burst mechanism. **Immunology series**, New York, v. 57, p. 46-76, 1992.

MEYER-HOFFERT, U.; WINGERTSZAHN, J.; WIEDOW, O. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. **Journal of Investigative Dermatology**, Chapel Hill, v.123, p.338-345, 2004.

MICHELIN, M.A.; CROTT, L.S.P.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; COIMBRA, T.M.; TEIXEIRA, J.E.; BARBOSA, J.E. Influence of the electric charge of the antigen and the immune complex (IC) lattice on the IC activation of human complement. **International Journal of Experimental Pathology**, London, v.83, p.105-110, 2002.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v.52, n.4, p.673-751, 2000.

MISRA, H.P.; SQUATRITO, P.M. The role of superoxide anion in peroxidase-catalyzed chemiluminescence of luminol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.215, n.1, p.59-65, 1982.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; FUJIMOTO, Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.41, p.759-765, 2003.

MIYAUCHI, H.; HASHIMOTO, S.; NAKAJIMA, M.; SHINODA, I.; FUKUWATARI, Y.; HAYASAWA, H. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. **Cellular Immunology**, v.187, p.34–37, 1998.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today**, Cambridge, v.20, n.12, p.535–537, 1999.

MONTANARI, C.A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.1, p.56–64, 1995.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v.92, p.349–355, 2005.

MORA, A.; PAYÁ, M.; RÍOS, J.L.; ALCARAZ, M.J. Structure–activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non–enzymic lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.40, n.4, p.793–797, 1990.

MOREIRA, M.R. **Estudo do mecanismo de ação de flavonóides no processo de produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados por complexos imunes de IgG/OVA**. 2004. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

MOTAI, T.; DAIKONYA, A.; KITANAKA, S. Sesquiterpene coumarins from *Ferula fukanensis* and nitric oxide production inhibitory effects. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.67, p.432–436, 2004.

MURAKAMI, A.; GAO, G.; OMURA, M.; YANO, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; TAKAHASHI, D.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.M. 1,1-Dimethylallylcoumarins potently suppress both lipopolysaccharide– and interferon- γ -induced nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.10, n.1, p.59–62, 2000.

MURRAY, R. H. D. Coumarins. **Natural Products Reports**, Cambridge, v.6, n.6, p.591–624, 1989.

NATHAN, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signalling. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.111, p.769–778, 2003.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, London, v.6, n.3, p.173–182, 2006.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, Berlin, v.66, n.8, p.709–23, 2000.

NICOLAIDES, D.N.; GAUTAM, D.R.; LITINAS, K.E. Synthesis and evaluation of the antioxidant and antiinflammatory activities of some benzo[1]khellactone derivatives and analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.29, p.323–32, 2004.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Davis, v.74, p.418-425, 2001.

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**, Pittsburgh, v.63, n.6, p.855-856, 2000.

OBINGER, C. Chemistry and biology of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.445, p.197-198, 2006.

OKETCH-RABAH, H.A.; MWANGI, J.W.; LISGARTEN, J.; MBERU, E.K. A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. **Fitoterapia**, Milano, v.71, n.6, p.636-640, 2000.

OLIVEIRA, C.A.; AZZOLINI, A.E.C.S.; SILVA, S.C.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; AZEVEDO, A.P.G.B.; GONÇALVES, C.F.F.; CORDEIRO, D.S.; LEITÃO, D.P.S.; GASPAR, L.R.; SOUZA, P.L.V.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; MANTOVANI, B. Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclética Química**. São Paulo, v.27A, n.esp., p.273-284, 2002.

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

OWUOR, E.D.; KONG, A.-N. T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.64, p. 765-770, 2002.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.282, p.1161-1168, 2001.

PASCUAL, M.; SCHIFFERLI, J.A. The binding of immune complexes by the erythrocyte complement receptor 1 (CR1). **Immunopharmacology**, Amsterdam, v.24, n.2, p.101-106, 1992.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**.4.ed. Edinburg and London, Livingstone, 1970. Cap.2, p.91: Media for culturing cells and tissue II - defined media.

PAYÁ, M; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R.S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.44, n.2, p. 205-214, 1992.

PAYÁ, M.; FERRÁNDIZ, M.L.; MIRALLES, F.; MONTESINOS, C.; UBEDA, A.; ALCARAZ, M. J. Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**, Aulendorf, v.43 (I), n.6, p.655-658, 1993.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P.A.; HERAS, B.; HOULT, J.R.S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.48, n.3, p.445-451, 1994.

PENDERGRAFT III, W.F.; PRESTON, G.A.; SHAH, R.R.; TROPSHA, A.; CARTER JR. C.W.; JENNETTE, J.C.; FALK, R.J. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. **Nature Medicine**, New York, v.10, p.72-79, 2004.

POPILSKIS, S.J.; OZ, M.C.; GORMAN, P.; FLORESTAL, A.; KOHN, D.F. Comparison of xylazine with tiletamine-zolazepam (Telazol) and zylazine-ketamine anesthesia in rabbits. **Laboratory Animal Science**, Cordova, v.41, n.1, p.51-53, 1991.

POTTER, N.S.; HARDING, C.V. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, p.2538-2546, 2001.

P.R. Vade-mécum 2004/2005. São Paulo: Soriak, c2004. 802p.

PRICOP, L.; SALMON, J.E. Redox regulation of Fc γ receptor-mediated phagocytosis: implications for host defense and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, v.4, n.1, p.85-95, 2002.

PULLAR, J.M.; VISSERS, M.C.M.; WINTERBOURN, C.C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells. **IUBMB Life**, London, v.50, n.4/5, p.259-266, 2000.

QUADRI-SPINELLI, T.; HEILMANN, J.; RAIL, T.; STICHER, O. Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.66, n.8, p.728-733, 2000.

QUINN, M.T.; GAUSS, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.76, p.760-781, 2004.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; POONAM, H.; MALHOTRA, S.; SINGH, A.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: dioxygenated 4-methylcoumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.6, p.833-839, 1998a.

RAJ, H.G.; SHARMA, R.K.; GARG, B.S.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; TYAGI, Y.K.; SINGH, A.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 3: a novel mechanism for the inhibition of biological membrane lipid peroxidation by dioxygenated 4-methylcoumarins mediated by the formation of a stable ADP-Fe-inhibitor mixed ligand complex. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.6, p.2205-2212, 1998b.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; SINGH, A.; TYAGI, Y.K.; JHA, H.N.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 4: hyperbolic activation of rat liver microsomal NADPH-cytochrome C reductase by the novel acetylator 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.7, p.369-373, 1999a.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; PRIYADARSINI, K.I.; MITTAL, J.P.; GOEL, S.; DAS, S.K.; SHARMA, S.K.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part 5: pulse radiolysis studies on the antioxidant action of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.7, p.2091-2094, 1999b.

RAJAN, T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. **Trends in Immunology**, Oxford, v.24, p.376-377, 2003.

RAVEL, R. **Laboratório clínico**: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. cap.23, p.323-342: Distúrbios ósseos e articulares e doenças vasculares do colágeno.

RAVETCH, J.V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.19, p.275-290, 2001.

REDDY, N.S.; MALLIREDDIGARI, M.R.; COSENZA, S.; GUMIREDDY, K.; BELL, S.C.; REDDY, E.P.; REDDY, M.V.R. Synthesis of new coumarin 3-(*N*-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.14, p.4093-4097, 2004.

REMOLD-O'DONNELL, E.; PARENT, D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. **Blood**, New York, v.85, n. 2, p.337-342, 1995.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.533-538, 2002.

ROBACHE-GALLEA, S; MORAND, V.; BRUNEAU, J.M.; SCHOOT, B.; TAGAT, E.; REALO, E.; CHOUAIB, S.; ROMAN-ROMAN, S. In vitro processing of human tumor necrosis factor- α . **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.23688-23692, 1995.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis - potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v.136, p.136-142, 2002.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, New York, v.90, p.909-928, 1997.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p.1307-1315, 2003.

ROSEN G.M.; POU, S.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.9, n.2, p.200-209, 1995.

ROSSI, F.; ZATTI, M. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leukocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. **Experientia**, Basel, v.20, n.1, p.21-23, 1964.

ROTH, G.J.; MAJERUS, P.W. The mechanism of the effect of Aspirin on human platelets: acetylation of a particulate fraction protein. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.56, p.624-32, 1975.

SAMBRANO, G.R.; HUANG, W.; FARUQI, T.; MAHRUS, S.; CRAIK, C.; COUGHLIN, S.R. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, p.6819-6823, 2000.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. 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. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap.16, p.403-434.

SBARRA, A.J.; KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.234, p.1355-1362, 1959.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J.A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.177, p.195-203, 2000.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 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. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap.15, p.371-399.

SCHIEVEN, G.L.; DE FEX, H.; STEPHENSON, L. Hypochlorous acid activates tyrosine phosphorylation signal pathways leading to calcium signaling and TNF-alpha production. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, 4:501-507, 2002.

SCHIFFERLI, J.A.; TAYLOR, R.P. Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes. **Kidney International**. New York. v.35, p.993-1003, 1989.

SCHULTZ, H.; WEISS, J.; CARROLL, S. F.; GROSS, W. L. The endotoxin-binding bactericidal/permeability-increasing protein (BPI): a target antigen of autoantibodies. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.69, p.505-512, 2001.

SCOTT, M. G.; DAVIDSON, D. J.; GOLD, M. R.; BOWDISH, D.; HANCOCK, R. E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.169, p.3883-3891, 2002.

SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.23, p.197-223, 2005.

SEGUCHI, H.; KOBAYASHI, T. Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils. **Journal of Electron Microscopy**, Tokyo, v.51, n.2, p.87-91, 2002.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.534, p.1-11, 2006.

SENGELØV, H. Complement Receptors in neutrophils. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton. v.15, n.2, p.107-131, 1995.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, New York, v.6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SHEPPARD, F.R.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; McLAUGHLIN, N.J.D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.78, p.1025-1042, 2005.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research – Clinical Anaesthesiology**, v.18, n.3, p.385-405, 2004.

SHIOSE, A.; KURODA, J.; TSURUYA, K.; HIRAI, M.; HIRAKATA, H.; NAITO, S.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; SUMIMOTO, H. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.276, n.2, p.1417-1423, 2001.

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; SILVA FILHO, A.A.-da; SOUZA, M.L.-de; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.94, p.59-65, 2004.

SIVEKE, J.T.; HAMMAN, A. T-helper 1 and T-helper 2 cells respond differentially to chemokines. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.160, p.550-554, 1998.

SONDERMANN, P.; KAISER, J.; JACOB, U. Molecular basis of immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. **Journal of Molecular Biology**, London, v.309, p.737-749, 2001.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.40, p.1478-1487, 1992.

SPARTAN '04 full, version 1.0.3. **Tutorial and User's Guide**. Irvine: Wavefunction Inc., 2005. (www.wavefun.com)

STEENSGAARD, J.; JOHANSEN, A.S. Biochemical aspects of immune complex formation and immune complex diseases. **Allergy**, Copenhagen, v.35, p.457-472, 1980.

STRIETER, R.M.; KASAHARA, K.; ALLEN, R.; SHOWELL, H.J.; STANDIFORD, T.J.; KUNKEL, S.L. Human neutrophils exhibit disparate chemotactic gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.173, p.725-730, 1990.

SUGAWARA, S.; UEHARA, A.; NOCHI, T.; YAMAGUCHI, T.; UEDA, H.; SUGIYAMA, A.; HANZAWA, K.; KUMAGAI, K.; OKAMURA, H.; TAKADA, H. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, n.11, p.6568-6575, 2001.

SWAIN, S.D.; ROHN, T.T.; QUINN, M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxidants and Redox Signaling**, New York, v.4, n.1, 2002.

SYLVESTRE, D.L.; RAVETCH, J.V. Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. **Science**, Washington, v.265, p.1095-1098, 1994.

TAKAHAMA, U.; EGASHIRA, T. Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v.30, p.73-77, 1991.

TAKAHAMA, U.; YOSHITAMA, K. Hydroxycinnamic acid esters enhance peroxidase-dependent oxidation of 3,4-dihydroxyphenylamine: differences in the enhancement among the esters. **Journal of Plant Research**, Sendai, v.111, p.97-100, 1998.

TAUBER, A.I. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.33, n.8, p.1367-1369, 1984.

TAWATA, M.; YODA, Y.; AIDA, K.; SHINDO, H.; SASAKI, H.; CHIN, M.; ONAVA, T.; Anti-platelet action of GU-7, a 3-arylcoumarin derivative, purified from glycyrrhizae radix. **Planta Medica**, Stuttgart, v.56, n.3, p.259-263, 1990.

THORPE, G.H.G.; KRICKA, L.J. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York, v.133, p.331-353, 1986.

TJELLE, T.E.; LOVDAL, T.; BERG, T. Phagosome dynamics and function. **BioEssays**, Cambridge, v.22, n.3, p.255-263, 2000.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology**, New York, v.7, p.581-591, 2005.

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

VAJRAGUPTA, O.; BOONCHOONG, P.; WONGKRAJANG, Y. Comparative quantitative structure-activity study of radical scavengers. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, New York, v.8, p. 2617-2628, 2000.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. Boca Raton, CRC Press, 1987. v.1.

VARANDA, E.A.; RADDI, M.S.G.; DIAS, F.L.; ARAÚJO, M.C.P.; GIBRAN, S.C.A.; TAKAHASHI, C.S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v.17, n.2, p.85-95, 1997.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, p.249-259, 2004.

VERDONK, M.L.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MURRAY, C.W.; TAYLOR, R.D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. **Proteins**, Hoboken, v.52, p.609-623, 2003.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a Química Medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M.T.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da; ALBUQUERQUE, S. de; OLIVA, G. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.73, n.3, p.617-622, 2001.

VIGNAIS, P.V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.59, p.1428-1459, 2002.

VISSER, S.P.de; SHAIK, S.; SHARMA, P.K.; KUMAR, D.; THIEL, W. Active species of horseradish peroxidase (HRP) and cytochrome P450: two electronic chameleons. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.125, p.15779-15788, 2003.

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-O-valeryl substitution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.55, p.399-405, 2003.

WAFFO, A.K.; AZEBAZE, G.A.; NKENGFACK, A.E.; FOMUM, Z.T.; MEYER, M.; BODO, B.; VAN HEERDEN, F.R. Indicanines B and C, two iso-avonoid derivatives from the root bark of *Erythrina indica*. **Phytochemistry**, Oxford, v.53, p.981-985, 2000.

WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, London, v.289, p.646-650, 1981.

WEIR, D.M. **Immunochemistry and molecular immunology**. 5ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986. 570p.

WEISS, S.J.; WARD, P.A. Immune complex induced generation of oxygen metabolites by human neutrophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.129, n.1, p.309-313, 1982.

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

WIEDOW, O.; MEYER-HOFFERT, U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v.257, p.319-328, 2005.

WIEN TJES, F.B.; SEGAL, A.W. NADPH oxidase and the respiratory burst. **Seminars in Cell Biology**, London, v.6, n.6, p.357-365, 1995.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.da; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap.8, p.317-334.

WILLEMS, J.; JONIAU, M.; CINQUE, S.; VAN DAMME, J. Human granulocyte chemotactic peptide (IL-8) as a specific neutrophil degranulator: comparison with other monokines. **Immunology**, Oxford, v.67, p.540-542, 1989.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.29, n.5, p.403-409, 2000.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; IKEHARA, N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. **Plant Physiology**, Hanover, v.115, p.1405-1412, 1997.

YANG, D.; CHEN, Q.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J.J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.58, p.978–989, 2000.

YANG, D.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.69, p.691–697, 2001.

YANG, E.B.; ZHAO, Y.N.; ZHANG, K.; MACK, P. Daphnetin, one coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.260, p.682–685, 1999.

YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R.L.; MILLER, E.G.; PIKE, L.M.; PATIL, B.S. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids and coumarins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.2009–2014, 2005.

YU, W.; LIU, Z.-Q.; LIU, Z.-L. Antioxidant effect of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of linoleic acid in micelles. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, Cambridge, p.969–974, 1999.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081p.

ZEYA, H.; SPITZNAGEL, J. Antibacterial and enzymatic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification. **Science**, Washington, v.142, p.1085–1087, 1963.

ZHANG, R.; BRENNAN, M.-L.; SHEN, Z.; MacPHERSON, J.C.; SCHMITT, D.; MOLEND, C.E.; HAZEN, S.L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, n. 48, p.46116–46122, 2002.

ZHAO, M. H.; LOCKWOOD, C. M. Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.103, p.397–402, 1996.

ZHOU, M.J.; BROWN, E.J. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. **Journal of Cell Biology**, New York, v.125, p.1407–1416, 1994.

ZHOU, P.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H.; CHEN, B.; HONDA, G.; ITOH, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; LEE, K.-H. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, Oxford, v.53, n.6, p.689–697, 2000.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, Cambridge, v.12, p.121–127, 2000.

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. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. Cap.23, p.578-614.